

**Über das Vorkommen
von Protoplasmatröpfchen im Sperma
der Haustiere sowie den Einfluß freier
Protoplasmatröpfchen auf Motilität
und Stoffwechsel von Bullenspermien**

Ahmed Gomaa M. Hassan

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555601_0007

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

ÜBER DAS VORKOMMEN VON PROTOPLASMATRÖPFCHEN IM SPERMA
DER HAUSTIERE SOWIE DEN EINFLUSS FREIER
PROTOPLASMATRÖPFCHEN AUF MOTILITÄT UND
STOFFWECHSEL VON BULLENSPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Ahmed Gomaa M. HASSAN
aus
Kairo/Ägypten

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. Kräußlich

Referent: Professor Dr. W. Leidl

Korreferent: Professor Dr. U. Lösch



Tag der Promotion: 23. Februar 1979

Meinen Eltern
und
meiner lieben Frau

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Zur Nomenklatur	2
2.2. Die Lokalisation der Protoplasmatröpfchen an den Spermien im Genitale und im Ejakulat	3
2.3. Der Einfluß sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen	5
2.4. Morphologie von Protoplasmatröpfchen	6
2.4.1. Beobachtungen mit dem Lichtmikroskop	6
2.4.2. Beobachtungen mit dem Elektronen- mikroskop	7
2.5. Histochemische, chemische und biochemische Untersuchungen an Protoplasmatröpfchen	8
2.6. Eigenschaften von Spermien mit anhängenden Protoplasmatröpfchen	10
2.7. nutritive Funktion von Protoplasmatröpfchen	11
2.8. Beziehungen von Protoplasmatröpfchen zur Reifung und zum Befruchtungsvermögen von Spermien	12
2.9. Methoden zur Zählung von anhängenden und freien Protoplasmatröpfchen	13
2.10. Methoden zur Isolierung von freien Protoplasmatröpfchen	14

	Seite
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
3.1. Material und Methode	16
3.1.1. Versuchsaufbau und Versuchstiere	16
3.1.1.1. Das Vorkommen von Protoplasma- tröpfchen sowie deren Haltbarkeit unter verschiedenen Lagerungsbedin- gungen bei Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Hund	16
3.1.1.2. Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasma- tröpfchen im Ejakulat beim Bullen	17
3.1.1.3. Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen auf die Motilität und den Stoffwechsel ge- waschener Spermien beim Bullen	18
3.1.1.3.1. Bestimmung von Motilität und Fruktoseverbrauch	18
3.1.1.3.2. Bestimmung von Motilität L-Milchsäureproduktion und ATP-Gehalt	19
3.1.2. Methoden	19
3.1.2.1. Spermagewinnung	19
3.1.2.2. Spermauntersuchung	20
3.1.2.3. Waschen der Spermien und Isolierung der Protoplasmatröpfchen	21
3.1.2.4. Quantitative photometrische Fruktosebestimmung	22
3.1.2.5. Photometrische Bestimmung der L-Milchsäure	23
3.1.2.6. ATP-Bestimmung	24
3.1.2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	25
3.1.2.8. Statistische Auswertung	25

	Seite
3.2. Ergebnisse	26
3.2.1. Vorkommen von Protoplasmatröpfchen bei verschiedenen Tierarten	26
3.2.2. Die Haltbarkeit von freien Protoplasma- tröpfchen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen	28
3.2.3. Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasma- tröpfchen im Ejakulat beim Bullen	31
3.2.4. Der Einfluß von isolierten Protoplasma- tröpfchen auf die Motilität und den Fruktoseverbrauch von gewaschenen Spermien beim Bullen	33
3.2.5. Der Einfluß von isolierten Protoplasma- tröpfchen auf die Vorwärtsbeweglichkeit, die L-Milchsäureproduktion und den ATP-Gehalt gewaschener Spermien beim Bullen	37
3.2.6. Ultrastruktur von freien Protoplasma- tröpfchen	43
4. DISKUSSION	46
5. ZUSAMMENFASSUNG	55
6. LITERATURVERZEICHNIS	59
Lebenslauf	69

1. EINLEITUNG

Die Spermauntersuchung ist in der Tiermedizin, insbesondere durch die Entwicklung der künstlichen Besamung, schon seit vielen Jahren ein wesentlicher Bestandteil der andrologischen Diagnostik. Neben den routinemäßig bestimmten Parametern für das Sperma sind für zahlreiche Fragestellungen spezielle Untersuchungsverfahren zur Erfassung besonderer Merkmale ausgearbeitet. Es ist deshalb überraschend, daß ein morphologischer Bestandteil des Spermas, nämlich das Protoplasmatröpfchen, bisher dabei praktisch unberücksichtigt blieb.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zunächst das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Sperma der wichtigsten Haussäugetiere zu untersuchen. Darüber hinaus sollte beim Rind, bei dem die künstliche Besamung und dadurch auch die Spermauntersuchung die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzen, ermittelt werden, ob den freien Protoplasmatröpfchen eine Funktion für den Spermienstoffwechsel und die Motilität zukommt.

2. LITERATUR

2.1. Zur Nomenklatur

Bereits im Jahre 1909 beschrieb RETZIUS in einer Arbeit über die testikulären und epididymalen Spermien von Pferd, Rind, Schwein, Schaf und Ziege Gebilde, die er Protoplasmatröpfchen, -kügelchen oder -ballen nannte. Andere Namen, die in der Literatur Verwendung fanden, lauten (zit. nach BISHOP und WALTON, 1960) "azidophiles Körperchen" (WILLIAMS und SAVAGE, 1925), "Equilibrateur" (POPA und MARZA, 1931) und "kinoplasmatisches Tröpfchen" (MERTON, 1939).

Zwar haben sich in der neueren Literatur die Bezeichnungen "Protoplasmatröpfchen" oder "Zytoplasmatröpfchen" weitgehend durchgesetzt, jedoch fehlt eine genaue Nomenklatur der Protoplasmatröpfchen bezüglich ihrer Lage am Spermium. Einige Autoren differenzieren zwischen proximalen und distalen Protoplasmatröpfchen, unabhängig von der Lokalisation des sie tragenden Spermiums im Genitale. Andere verwenden den Begriff "Nebenhodenspermien" als Synonym für Spermien mit Protoplasmatröpfchen, ohne darauf einzugehen, wo die Protoplasmatröpfchen festgestellt worden waren.

In der folgenden Literaturübersicht wurde trotzdem versucht, sowohl die Lokalisation der Spermien im Genitale als auch die jeweilige Lage der Protoplasmatröpfchen am Spermium anzugeben, soweit dies den einzelnen Arbeiten zu entnehmen war.

2.2. Die Lokalisation der Protoplasmatröpfchen an den Spermien im Genitale und im Ejakulat

Bei allen Säugetieren ist bisher nachgewiesen, daß während der Spermiogenese, d.h. der Transformation der Spermatiden zu Spermatozoen, ein Teil des Zytoplasmas vom Spermienkopf zum Halsstück wandert und hier als proximales Protoplasmatröpfchen in Erscheinung tritt. Im Laufe der Passage durch den Nebenhoden wandert das Protoplasmatröpfchen nach distal bis zum Ende des Mittelstücks und wird nun als distales Protoplasmatröpfchen bezeichnet.

Beim Bullen scheint diese Wanderung hauptsächlich im Nebenhodenkopf stattzufinden (BIALY und SMITH, 1958). Bei Untersuchungen an Schlachttieren zeigte sich nämlich, daß im Nebenhodenkopf 52,3% der Spermien proximale und 9,3% distale Protoplasmatröpfchen besaßen. Im Nebenhodenkörper trugen nur noch 1% der Spermien proximale, dagegen 40% distale Protoplasmatröpfchen und im Nebenhodenschwanz betrugen die entsprechenden Werte 1% bzw. 83,2%. Daraus resultieren rechnerisch sehr unterschiedliche Anteile von Spermien ohne Protoplasmatröpfchen im Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz von 38,3%, 59,0% und 15,8%. In der Ampulle des Ductus deferens besaßen 94% der Spermien kein Protoplasmatröpfchen mehr. Andere Autoren beziffern, ebenfalls beim Rind, diesen Wert mit 77% (BRANTON und SALISBURY, 1947) oder geben eine Schwankungsbreite von 88% bis 99% an (RAO und HART, 1948).

RAO und BERRY (1949) untersuchten die Wanderung der Protoplasmatröpfchen beim Schwein in Nebenhoden, die sie bei Kastrationen erhielten. Der Anteil von Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen im Nebenhodenkopf schwankte

zwischen 40% und 81% und sank im Nebenhodenschwanz auf Werte zwischen 1% und 10%. Entsprechend stieg der Prozentsatz von Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen von 12% bis 56% auf 45% bis 72%. Während im Nebenhodenkopf nur wenige Spermien ohne Protoplasmatröpfchen zu finden waren, wurden davon im Nebenhodenschwanz zwischen 25% und 53% gezählt. Eine ähnliche Verteilung der Protoplasmatröpfchen wurde beim Kaninchen an operativ entfernten Nebenhoden festgestellt (BEDFORD, 1963). Im Nebenhodenkopf besaßen durchschnittlich 59% der Spermien proximale und 29% distale Protoplasmatröpfchen, während 12% ohne Protoplasmatröpfchen waren. Im Nebenhodenschwanz lauteten die entsprechenden Werte 8%, 26% und 66%.

Beim Menschen dagegen wandern die Protoplasmatröpfchen nicht von proximal nach distal, sondern können noch im Ejakulat in ihrer ursprünglichen Lage am Spermium beobachtet werden (WILLIAMS, 1950; ZAMBONI et al., 1968).

Über den Anteil von Spermien mit proximalen oder distalen Protoplasmatröpfchen im Ejakulat finden sich nur wenig detaillierte Angaben. Beim Rind werden ca. 1% genannt (RAO und HART, 1948), für das Schaf Werte zwischen 0% und 10% (WHITE und WALES, 1961) und für das Kaninchen 4% angegeben (PAUFLER und FOOTE, 1968). DAUSEND (1974) fand in 440 Ejakulaten von 50 Ebern einen durchschnittlichen Anteil von 19,9%, die sich aus 7,4% proximalen und 12,5% distalen Protoplasmatröpfchen zusammensetzen.

Die abgelösten oder freien Protoplasmatröpfchen können nur noch zum Teil im Ejakulat nachgewiesen werden. Setzt man die Zahl der Spermien gleich 100%, so wurden beim Bullen noch 25% (DOTT und DINGLE, 1968), 33% (HARRISON und WHITE, 1972 b) oder 79% (WEITZE, 1976) freie Protoplasmatröpfchen gefunden.

Beim Schafbock wurden dementsprechend noch 50% (DOTT und DINGLE, 1968) bzw. 40% (HARRISON und WHITE, 1972 b) und beim Schwein 77% (HARRISON und WHITE, 1972 b) freie Protoplasmatröpfchen gezählt.

2.3. Der Einfluß sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen

In der älteren Literatur wird wiederholt die Ansicht geäußert, daß mit steigender sexueller Beanspruchung die Zahl von Spermien mit anhängenden Protoplasmatröpfchen im Ejakulat zunimmt, ohne daß dies durch eindeutige experimentelle Untersuchungen nachgewiesen worden wäre (ROEMMELE, 1926; LAGERLÖF, 1934; GÖTZE, 1949; BLOM, 1950).

SMIDT (1961) berichtet, daß beim Schwein nach täglich zweimaliger Spermagewinnung über 5 Tage eine signifikante Vermehrung "unreifer Spermien" (als Synonym für Spermien mit Protoplasmatröpfchen) auftrat. Im Gegensatz dazu beobachtete TIETJE (1965) bei gleichem Versuchsaufbau eine anfängliche Verminderung der Zahl von Spermien mit Protoplasmatröpfchen, der aber ein erneuter Anstieg folgte, so daß bei Versuchsende in etwa wieder der Ausgangswert erreicht wurde. Eine täglich einmalige Absamung über 39 Tage hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Häufigkeit von Spermien mit Protoplasmatröpfchen im Ejakulat beim Eber (ROHLOFF, 1973). Zum gleichen Ergebnis kamen auch LEIDL und BIEGERT (1968), die bei 10 Bullen (Deutsches Fleckvieh, Alter 12 - 15 Monate) während einer sexuellen Belastungsperiode von 8 Wochen (3 x 2 Ejakulate wöchentlich) die Spermaqualität überprüften.

Bullen, bei denen 12 Wochen lang wöchentlich zweimal, jeweils innerhalb von 5 Minuten, eine Spermagewinnung mittels Elektroejakulation durchgeführt wurde, wiesen in den Erstejakulaten signifikant weniger Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen auf (3,9% gegenüber 7,7%) als in den Zweitejakulaten (FURMAN et al., 1975).

2.4. Morphologie von Protoplasmatröpfchen

2.4.1. Beobachtungen mit dem Lichtmikroskop

Das proximale Protoplasmatröpfchen aus dem Hoden und Nebenhodenkopf von Bulle (BRANTON und SALISBURY, 1947; RAO und HART, 1948), Büffel, Ziege und Schaf (GURAYA, 1963) sowie Eber (REDENZ, 1924; RAO und BERRY, 1949) hat eine runde oder birnenförmige Gestalt. Es liegt direkt hinter dem Spermienkopf und umschließt den Spermienhals völlig. Das Protoplasmatröpfchen ist ganz von der Zellmembran des Spermiums eingeschlossen (BLOOM und NICANDER, 1961).

Mit der Wanderung des Protoplasmatröpfchens entlang dem Mittelstück erscheint seine zytoplasmatische Masse kompakter, die Anhaftung an das Mittelstück wird lockerer und es scheint an Größe abzunehmen (RAO und BERRY, 1949). Wenn das Protoplasmatröpfchen das distale Ende des Mittelstücks erreicht, nimmt es eine mehr exzentrische Lage am Spermien Schwanz ein (RAO und HART, 1948; BLOOM und NICANDER, 1961; BAVDEK und GLOVER, 1970). Bei Säugetieren beinhalten an Nebenhodenspermien haftende Protoplasmatröpfchen einen dunklen, ovalen Körper, der an ihrer Peripherie liegt (RETZIUS, 1909).

Die distalen Protoplasmatröpfchen der Ratte sind größer als die des Kaninchens und diese sind wiederum größer als die von Schafbock und Bulle (BLOOM und NICANDER, 1961; MONIEM und GLOVER, 1972). DOTT und DINGLE (1968) geben den Durchmesser von freien Protoplasmatröpfchen aus dem Ejakulat von Bullen und Schafböcken mit ca. 3 μ m an. Darüber hinaus beobachteten sie in diesen Protoplasmatröpfchen eine dunkle granulierte Zone, die dem von RETZIUS (1909) beschriebenen ovalen Körper entspricht.

2.4.2. Beobachtungen mit dem Elektronenmikroskop

BLOOM und NICANDER (1961) haben die Entwicklung des Protoplasmatröpfchens während der Spermiogenese bei Rind und Kaninchen untersucht ohne besondere Speziesunterschiede gefunden zu haben. Bei der Transformation von Spermatiden zum Spermium strebt, während am vorderen Kernpol das Akrosom gebildet wird, am hinteren Kernpol das distale Zentriol zusammen mit dem restlichen Zytoplasma vom Kern weg. Der Golgiapparat folgt dieser Bewegung und verliert dabei seine typische Struktur, indem er eine lockere, vesikuläre Form bekommt. Dabei werden Vesikel in das umgebende Zytoplasma abgegeben, die sich mit ähnlichen Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums vermengen, so daß eine eindeutige Zuordnung zu den ursprünglichen Zellorganellen nicht mehr möglich ist. In dem so gebildeten Protoplasmatröpfchen entwickeln sich bereits die für spätere Formen charakteristischen Vesikel und Tubuli. Wird das Spermium in das Lumen der Samenanälchen abgegeben, nehmen diese Tubuli an Zahl zu und das Zytoplasma des Protoplasmatröpfchens erscheint dichter. Eine ganz ähnliche Struktur besitzen Protoplasmatröpfchen von testikulären Spermien beim Schaf (VOGLMAYR et al., 1971), sowie proximale Protoplasmatröpfchen aus dem Nebenhodenkopf von Rind und Schaf (BLOOM und NICANDER, 1961). Auch diese Autoren beobachteten in einem sehr dichten Zytoplasma zahlreiche, parallel angeordnete Tubuli und Lamellen, zwischen denen einzelne, verstreut liegende Vesikel zu finden waren.

Distale Protoplasmatröpfchen aus dem Nebenhodenschwanz von Rind und Schaf zeigen dagegen einen deutlichen Wandel in ihrer Struktur (BLOOM und NICANDER, 1961). Sie bestehen vor allem aus abgeflachten Lamellen mit U-förmigen oder runden Profilen. Zum Teil treten solche Lamellen auch konzentrisch geschichtet an der Peripherie des Protoplasmatröpfchens auf. Dieselben Beobachtungen wurden von GARBERS et al. (1970) an distalen und an abgelösten (freien) Protoplasmatröpfchen aus dem Nebenhoden von Bullen, sowie von DOTT und DINGLE (1968) an freien Protoplasmatröpfchen aus dem Ejakulat von Rind und Schaf gemacht.

2.5. Histochemische, chemische und biochemische Untersuchungen an Protoplasmatröpfchen

In Protoplasmatröpfchen von Spermien aus Hoden oder Nebenhoden wurden bei Rind, Büffel, Schaf und Ziege argento-phile Stränge oder Granula sowie osmiophile Elemente gefunden (GRESSON und ZLOTNIK, 1945 und 1948; GURAYA, 1963). Dies wurde als Beweis für den Ursprung dieser Elemente vom Golgiapparat angesehen, ebenso wie der Nachweis von sauren Mukopolysacchariden in Protoplasmatröpfchen (POZZI, 1956). Außerdem sollen Protoplasmatröpfchen von Büffel, Schaf und Ziege Mitochondrien in Form von sudanophoben Granula sowie auch Ribonukleinsäure enthalten (GURAYA, 1963).

Mit Hilfe chromatographischer Methoden wiesen CLEGG und FOOTE (1973) Phospholipide in isolierten Protoplasmatröpfchen des Bullen nach. Nach ihrer Ansicht resultiert der extrazelluläre Phospholipidgehalt im Bullensperma zu zwei Dritteln aus freien Protoplasmatröpfchen.

DOTT und DINGLE (1968) untersuchten als erste die enzymatische Ausstattung von Protoplasmatröpfchen bei Rind und Schaf. Die Autoren fanden mehrere lysosomale Enzyme:

Saure Phosphatase, saure Protease, β -Glucuronidase, Arylsulphatase, Ribonuclease und Desoxyribonuclease. GARBERS et al. (1970) wiesen außer diesen Enzymen noch 5-Nucleotidase, β -Galactosidase und alkalische Phosphatase in Protoplasmatröpfchen von Bullenspermien nach. Darüber hinaus enthalten Protoplasmatröpfchen bei Rind, Schaf und Schwein auch Enzyme aus dem intermediären Kohlenhydratstoffwechsel, nämlich Glukose-Phosphat-Isomerase, Lactat-Dehydrogenase und Hexokinase (HARRISON und WHITE, 1972 b); beim Bullen auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (WEITZE, 1976) sowie Sorbitol-Dehydrogenase und Aldolase (GARBERS et al., 1970). Nach Ansicht dieser Autoren stammt ein Großteil der im Seminalplasma nachgewiesenen Aktivität von saurer Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase sowie von Glykosidasen aus aufgelösten Protoplasmatröpfchen.

GARBERS et al. (1970) konnten bei einer Inkubation von Protoplasmatröpfchen mit 5mM Glukose weder einen Glukose- oder Sauerstoffverbrauch noch eine Milchsäureproduktion feststellen und schlossen daraus, daß, ungeachtet des Gehalts an Glykosidasen, Protoplasmatröpfchen metabolisch inert sind.

Bei der Ratte (ROBERTS et al., 1976) und beim Kaninchen (MONIEM und GLOVER, 1972) wurde nachgewiesen, daß distale gegenüber proximalen Protoplasmatröpfchen eine geringere Hydrolasenaktivität besitzen. Da ein Verlust dieser Enzyme nach außen ausgeschlossen werden konnte, wurde dies als ein Anzeichen für eine "biochemische Degeneration" während der Wanderung der Protoplasmatröpfchen gewertet.

2.6. Eigenschaften von Spermien mit anhängenden Protoplasmatröpfchen

LASLEY und BOGART (1944) überprüften den Prozentsatz lebender Nebenhoden- und Ejakulatspermien des Ebers nach einer schnellen Abkühlung auf 0°C mit Hilfe einer Opalblau-Eosin-Färbung. Während vor dieser Behandlung 91,0% der Nebenhoden- und 75,7% der Ejakulatspermien als "lebend" klassifiziert wurden, blieben 10 Minuten nach der Abkühlung nur mehr 65,0% bzw. 12,5% der Spermien ungefärbt. Ebenso überlebten epididymale Spermien eine 16-tägige Lagerung bei 10-12°C häufiger (51,2%) als Ejakulatspermien (9,6%). Die Autoren sehen dieses Ergebnis im Zusammenhang mit der Beobachtung, daß fast alle Nebenhodenspermien ein Protoplasmatröpfchen trugen, ejakulierte Spermien dagegen nur in geringer Anzahl.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Kälteresistenz von Nebenhoden- und Ejakulatspermien erzielten WHITE und WALES (1961) beim Schaf. Sie fanden zudem eine positive Korrelation zwischen dem Anteil von epididymalen Spermien mit Protoplasmatröpfchen und dem Prozentsatz überlebender Spermien. Dieselben Autoren untersuchten auch den Einfluß mehrerer Faktoren auf die Loslösung der Protoplasmatröpfchen von Nebenhodenspermien in vitro. Weder eine 24-stündige Lagerung bei Zimmertemperatur noch eine 2-stündige Inkubation bei + 37°C mit Seminalplasma, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Ribonuclease und Amylase veränderte die Zahl von Spermien mit Protoplasmatröpfchen. Dagegen führte eine 2-stündige Inkubation mit Hyaluronidase zu einer Verminderung dieses Prozentsatzes auf 55% gegenüber 79% bei Kontrollproben. Eine nur 5-minütige Inkubation von Nebenhodenspermien des Bullen mit Samenblasensekret reduzierte den Anteil von Spermien mit Protoplasmatröpfchen signifikant (BIALY und SMITH, 1958).

2.7. Nutritive Funktion von Protoplasmatröpfchen

In der wissenschaftlichen Literatur sind bislang fast nur Vermutungen über eine nutritive Funktion der Protoplasmatröpfchen geäußert worden. MANN (1964) erklärt den Zeitpunkt der Ablösung der Protoplasmatröpfchen von den Spermien kurz vor oder während der Ejakulation mit dem Verlust ihrer Funktion als endogene Energiequelle, da nun die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen dafür zur Verfügung stehen. Die Tatsache, daß Protoplasmatröpfchen des Kaninchens eine hohe Aktivität von alkalischer Phosphatase besitzen, führte BAVDEK und GLOVER (1970) zu der Vermutung, daß Spermien mit Hilfe dieses Enzyms im Nebenhodenepithel vorkommendes Glykogen umsetzen können. Auch aus dem histochemischen Nachweis von Mitochondrien in Protoplasmatröpfchen von Büffel, Ziege und Schaf wurde auf eine endogene nutritive Funktion geschlossen (GURAYA, 1963). Mit Hilfe von radioaktiv markierter Glukose konnten ROBERTS et al. (1976) in Nebenhodenspermien der Ratte mit proximalen Protoplasmatröpfchen eine Synthese von Inositol feststellen, die sich zu etwa gleichen Teilen auf das Spermium und das Protoplasmatröpfchen verteilte. In Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen wurde ein Abfall der Inositol-Synthese beobachtet, der aber fast ausschließlich auf eine Reduzierung dieses Stoffwechselweges im Protoplasmatröpfchen zurückzuführen war. In eine ähnliche Richtung deuten die Ergebnisse von VOGLMAYR et al. (1971), die den Stoffwechsel und die Ultrastruktur von testikulären Schafspermien vor und nach einer Hitzebehandlung des Testes (3 Stunden bei 40,5°C) untersuchten. Die respiratorische, glykolytische und synthetische Aktivität der Spermien nach der Hitzebehandlung war signifikant erniedrigt. Damit verbunden war ein Wandel der Ultrastruktur der Protoplasmatröpfchen. Anstelle der typischen Tubuli und Lamellen in einem dichten Zytoplasma (s. 2.4.2.) erschienen nun zahlreiche, von flachen Membranen begrenzte Vesikel.

2.8. Beziehungen von Protoplasmatröpfchen zur Reifung und zum Befruchtungsvermögen von Spermien

Die Tatsache, daß die Reifung der Spermien im Nebenhoden und die Wanderung der Protoplasmatröpfchen von proximal nach distal zur gleichen Zeit ablaufen, hat dazu geführt, der Lokalisation der Protoplasmatröpfchen am Spermien-schwanz eine Indikatorrolle für den Reifezustand der Spermien zuzuschreiben. Demzufolge werden Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen als "unreif" bezeichnet (REDENZ, 1924; LAGERLÖF, 1934; GÖTZE, 1949; BLOM, 1950; MANN, 1964).

Über das Befruchtungsvermögen von Sperma, das einen erhöhten Anteil solcher unreifer Spermien besitzt, ist wenig bekannt. Bei 7 subfertilen Ebern wurden 50% bis 100% Spermien mit vorwiegend proximalen Protoplasmatröpfchen ermittelt (BEDUHN und ABSHAGEN, 1965). Besamungen mit verdünntem Ebersperma, das mehr als 10% Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen enthielt, führten zu einem signifikanten Abfall der Konzeptionsergebnisse. Für den Gesamtanteil von Protoplasmatröpfchen und für den Prozentsatz an distalen Protoplasmatröpfchen war kein negativer Einfluß nachzuweisen (DAUSEND, 1974).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Tier läßt beim Mann das disintegrierte proximale Protoplasmatröpfchen keinen Rückschluß auf den Reifezustand des Spermiums zu. Ist jedoch das Protoplasmatröpfchen noch intakt, groß ausgebildet und umgibt es das Mittelstück noch ganz, so wird dies als pathologische Form angesehen. Eine klinische Bedeutung ist jedoch nicht bekannt (WILLIAMS, 1950).

2.9. Methoden zur Zählung von anhängenden und freien Protoplasmatröpfchen

Für die Zählung von Protoplasmatröpfchen stehen prinzipiell 2 Techniken zur Verfügung, die mit jeweils geringfügigen Modifikationen Anwendung finden.

Die erste Möglichkeit besteht in der Anfertigung eines gefärbten und getrockneten Ausstrichpräparates, wie es üblicherweise zur Beurteilung der Morphologie von Spermien verwendet wird. Zur Anfärbung wurde Opalblau-Eosin (LASLEY und BOGART, 1944; RAO und HART, 1948), Eosin-Nigrosin (BIALY und SMITH, 1958) oder Methylviolett (TIETJE, 1965) benutzt. Die Auszählung erfolgte bei 800 bis 900-facher Vergrößerung bei Hellfeldbeleuchtung. Auf die Gefahr, daß bei der Präparation anhängende Protoplasmatröpfchen ihre Lokalisation am Spermienschwanz verändern oder sich ganz ablösen, haben bereits mehrere Autoren hingewiesen (BLOM, 1943; GÖTTLING, 1952; BIALY und SMITH, 1958). Darüber hinaus werden freie Protoplasmatröpfchen nicht oder nicht zuverlässig erfaßt.

Eine zweite Möglichkeit stellt die Flüssigfixierung einer Spermaprobe oder Protoplasmatröpfchensuspension dar. Als Fixiermittel wird entweder eine phys. Kochsalzlösung mit Zusatz von Formalin (WHITE und WALES, 1961; HARRISON und WHITE, 1972 b), oder eine Fixierlösung nach HANCOCK (1956) verwendet (DAUSEND, 1974). DOTT und DINGLE (1968) verdünnen die zu untersuchenden Proben mit einer Salzlösung ohne Formalin-Zusatz. Für die Zählung von anhängenden Protoplasmatröpfchen wird ein Tropfen einer auf diese Weise verdünnten Spermaprobe auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt (WHITE und WALES, 1961; DAUSEND, 1974). Die Dichte von freien Protoplasmatröpfchen bestimmten DOTT und DINGLE (1968) sowie HARRISON und WHITE (1972 b) mit Hilfe einer Zählkammer. Die Auswertung erfolgte jeweils im Phasenkontrastmikroskop bei hohen Vergrößerungen. Allerdings

gelang die Zählung der freien Protoplasmatröpfchen beim Eber (HARRISON und WHITE, 1972 a) erst, nachdem das Ejakulat mit einem Milchverdünner verdünnt und über Nacht im Kühlschrank gelagert worden war. Die im Frischsperma gefundenen Konglomerate von freien Protoplasmatröpfchen, die eine Auszählung unmöglich gemacht hatten, verschwanden dabei wieder.

2.10 Methoden zur Isolierung von freien Protoplasmatröpfchen

Die ersten Versuche zur Isolierung von freien Protoplasmatröpfchen bei Rind und Schaf wurden von DOTT und DINGLE (1968) durchgeführt. Nach einer zweimaligen Zentrifugation des unverdünnten Spermas (15 Minuten bei 1 000 g und 5 Minuten bei 4 300 g) erhielten sie einen Überstand, der filtriert und danach erneut zweimal bei 20 000 g jeweils 20 Minuten zentrifugiert wurde. Das Sediment aus der letzten Zentrifugation enthielt Protoplasmatröpfchen ohne jeden Zusatz von Spermien.

Um die bei dieser Methode notwendigen hohen Zentrifugalkräfte und die damit verbundene Schädigung von Spermien und Protoplasmatröpfchen zu vermeiden, entwickelten HARRISON und WHITE (1972 b) ein anderes Verfahren. Das Ejakulat wurde dabei mit einem Milchverdünner auf eine Dichte von 100 000 bis 200 000 Spermien/mm³ eingestellt, sehr langsam auf + 4°C abgekühlt und über Nacht so aufbewahrt. Auch die weiteren Schritte des Trennverfahrens wurden bei dieser Temperatur ausgeführt. Die Temperaturerniedrigung sollte eine reversible Immobilisierung der Spermien bewirken, so daß geringere Zentrifugalkräfte für eine Sedimentierung genügen. Eine erste Zentrifugation bei 400 g (15 Minuten) führte daraufhin bereits zu einer weitgehenden Trennung. Der Überstand wurde noch einmal 20 Minuten bei 1 000 g und der dabei entstehende Überstand 30 Minuten bei 4 000 g zentrifugiert. Das Sediment der letzten Zentrifugation enthielt nur Protoplasmatröpfchen, die fast alle morphologisch intakt zu sein schienen.

Das Prinzip einer Dichtegradientenzentrifugation verwendeten erstmals GARBERS et al. (1970), um Protoplasmatröpfchen von Nebenhodenspermien des Bullen zu isolieren. Eine Spermiesuspension (Dichte $1-3 \times 10^9/\text{ml}$) wurde in einem Zentrifugenglas auf eine 1,0-molare Saccharoselösung geschichtet und darüber eine 0,25-molare Saccharoselösung gegeben. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1 500 g bildete sich am Boden der 1-molaren Saccharoschicht ein Spermienpellet, während in der 0,25-molaren Schicht darüber vorwiegend Protoplasmatröpfchen mit nur wenigen Spermien zu finden waren. Diese Fraktion wurde durch nochmalige Zentrifugation weiter aufgetrennt, so daß eine reine Protoplasmatröpfchenfraktion entstand.

WEITZE (1976), der ebenfalls mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation freie Protoplasmatröpfchen aus Bullenejakulaten isolierte, verwendete als Gradienten ein Medium (Zusammensetzung s. 3.1.2.3.), dem im Verlauf der Trennung 5% bis 10% Ficoll (Molekulargewicht $400\,000 \pm 100\,000$) zugesetzt wurde. Das Sperma wurde mit dem reinen Medium auf eine Dichte von $100\,000 - 200\,000$ Spermien/ mm^3 eingestellt. 2 ml davon wurden auf 5 ml Medium + 5% Ficoll geschichtet und 5 Minuten bei 500 g und 10 Minuten bei 1 000 g zentrifugiert. Eine erste Protoplasmatröpfchenfraktion, die sich im Überstand bildete, wurde vorerst aufbewahrt. Das Spermienpellet wurde mit Medium + 5% Ficoll aufgeschwemmt und 2 ml dieser Suspension mit 5 ml Medium + 10% Ficoll überschichtet. Nachdem die Zentrifugation genau wie vorher durchgeführt worden war, entstand eine zweite Protoplasmatröpfchenfraktion, die zusammen mit der ersten erneut 25 Minuten bei 8 000 g zentrifugiert wurde. Auf diese Weise bildete sich am Boden des Zentrifugenglases ein reines Protoplasmatröpfchenpellet.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methode

3.1.1. Versuchsaufbau und Versuchstiere

Die eigenen Untersuchungen über das Vorkommen und die Bedeutung von Protoplasmatröpfchen im Sperma wurden in 3 Versuchsabschnitte unterteilt:

- a) Das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen sowie deren Haltbarkeit unter verschiedenen Lagerungsbedingungen bei Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Hund
- b) Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Ejakulat beim Bullen
- c) Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen auf die Motilität und den Stoffwechsel gewaschener Spermien beim Bullen.

3.1.1.1. Das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen sowie deren Haltbarkeit unter verschiedenen Lagerungsbedingungen bei Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Hund

Von je 3 männlichen Tieren der Spezies Pferd (1 Traber, 1 Bayerisches Warmblut, 1 Fjordpferd), Rind (Deutsches Fleckvieh), Schaf (Merinolandschaf), Schwein (Deutsches veredeltes Landschwein) und Hund (Boxer) sowie von einem Ziegenbock (Deutsche bunte Edelziege), wurde je ein Ejakulat gewonnen. Alle Tiere waren gesund, Geschlechtsorgane und -funktionen waren ohne Besonderheiten. Unmittelbar nach der Gewinnung des Ejakulats wurden, neben allgemeinen andrologischen Merkmalen, folgende Parameter bestimmt: Die Spermiedichte, die Anzahl der Spermien mit proximalen oder distalen Protoplasmatröpfchen

sowie die Anzahl der freien Protoplasmatröpfchen, jeweils bezogen auf 1 Kubikmillimeter Sperma (0-Stunden-Werte).

Danach wurden von jedem Ejakulat 4 Proben von je 0,5 ml Sperma abgeteilt und in verschlossenen 2 ml-Plastikröhrchen 24 Stunden bei folgenden Temperaturen gelagert:

- a) + 38°C (Brutschrank)
- b) ca. + 22°C (Zimmertemperatur)
- c) ca. + 4°C (Kühlschrank, Abkühlzeit 30 Minuten)
- d) ca. + 4°C (Kühlschrank, Abkühlzeit 3 Stunden)

Nach 6 sowie nach 24 Stunden wurde die Spermiendichte und die Zahl der Protoplasmatröpfchen (s.o.) erneut in allen Proben ermittelt.

3.1.1.2. Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Ejakulat beim Bullen

Von 6 klinisch gesunden Bullen (Deutsches Fleckvieh, Alter 2-3 Jahre) mit ungestörten Sexualfunktionen, wurden je 10 Ejakulate im Abstand von 2-3 Tagen gewonnen. Dieser Kontrollperiode mit einer als durchschnittlich angesehenen sexuellen Belastung folgte eine Periode erhöhter sexueller Beanspruchung. Dazu wurden von jedem Tier 10 x im Abstand von 2-3 Tagen je 3 Ejakulate innerhalb von 30 Minuten gewonnen.

Jeweils unmittelbar nach der Gewinnung der Ejakulate wurden die gleichen Parameter wie die im vorhergehenden Versuch (S. 3.1.1.1.) als 0-Stunden-Werte bezeichneten Merkmale ermittelt.

3.1.1.3. Der Einfluß von isolierten Protoplastatröpfchen auf die Motilität und den Stoffwechsel gewaschener Spermien beim Bullen

3.1.1.3.1. Bestimmung von Motilität und Fruktoseverbrauch

Als Versuchstiere standen 3 klinisch gesunde Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 1,5 - 2 Jahren zur Verfügung. Sexualverhalten und Spermaqualität waren bei allen Tieren physiologisch. Von jedem Bullen wurden 3 Ejakulate im Abstand von jeweils 2-3 Tagen gewonnen. Unmittelbar nach der Gewinnung wurden bei jedem Ejakulat die freien Protoplastatröpfchen isoliert und im gleichen Arbeitsgang die Spermien gewaschen (s. 3.1.2.3.). Die dabei entstehenden Spermien-, bzw. Protoplastatröpfchen-pellets, wurden in Ringer-Phosphat-Puffer nach MANN (1964), dem pro 100 ml 0,3 g Fruktose zugesetzt worden war (= mod. Ringer-Phosphat-Puffer), suspendiert. Danach wurden folgende 4 Probenansätze gebildet:

Probe 1

0,8 ml Spermien suspension + 0,8 ml Protoplastatröpfchen-suspension

Probe 2

0,8 ml Spermien suspension + 0,8 ml mod. Ringer-Phosphat-Puffer

Probe 3

0,8 ml Protoplastatröpfchensuspension + 0,8 ml mod. Ringer-Phosphat-Puffer

Probe 4

1,6 ml mod. Ringer-Phosphat-Puffer

Die Proben wurden in verschlossenen 2 ml-Plastikröhrchen bei + 38°C im Brutschrank inkubiert. Bei 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden Inkubationsdauer wurde in Probe 1 und 2 der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien mikroskopisch durch Schätzung ermittelt und in allen Proben der Fruktosegehalt bestimmt (s. 3.1.2.4.).

3.1.1.3.2. Bestimmung von Motilität, L-Milchsäureproduktion und ATP-Gehalt

Von 3 Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 2 - 5 Jahren, deren Gesundheitszustand und Geschlechtsfunktion keine Besonderheiten aufwiesen, wurden je 3 Ejakulate im Abstand von 2-3 Tagen gewonnen. Die Ejakulate wurden wie im vorhergehenden Versuch aufgearbeitet und ebenso die entsprechenden Probenansätze gebildet, jedoch diente an Stelle von modifiziertem Ringer-Phosphat-Puffer das in 3.1.2.3. beschriebene Waschmedium ohne Ficoll-Zusatz als Suspensionsmedium. Alle Proben wurden wieder in verschlossenen 2 ml-Plastikröhrchen bei + 38°C im Brutschrank gelagert. Bei 0, 3 und 6 Stunden wurde in Probe 1 und 2 der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien geschätzt und in allen Proben die L-Milchsäure und der ATP-Gehalt ermittelt (s. 3.1.2.5. und 3.1.2.6.).

3.1.2. Methoden

3.1.2.1. Spermagewinnung

Bei Pferd, Rind, Schaf, Ziege und Schwein erfolgte die Spermagewinnung mittels einer künstlichen Scheide. Beim Hund wurde ein elektrisch betriebenes Vibrationsgerät (SCHEFELS, 1969) verwendet.

3.1.2.2. Spermauntersuchung

Jedes Ejakulat wurde zuerst makroskopisch und mikroskopisch nach üblichen andrologischen Gesichtspunkten untersucht. Es wurden nur Samenproben verwendet, deren Merkmale im physiologischen Bereich lagen. Ausgenommen davon blieben Ejakulate mit einer verminderten Dichte, insbesondere bei den Versuchen mit einer erhöhten sexuellen Belastung. Die Bestimmung der Spermiedichte, der Anzahl von Spermien mit proximalen oder distalen Protoplasmatröpfchen, sowie der Anzahl von freien Protoplasmatröpfchen erfolgte jeweils in einem Arbeitsgang. Dazu wurde Sperma mit Ringer-Phosphat-Puffer nach MANN (1964), dem 0,05% Formalin zugesetzt war, im Verhältnis 1 : 100 verdünnt. Dies geschah mit Hilfe einer Pipette, wie sie zur Erythrozytenzählung verwendet wird. Die Pipette wurde 1 Minute lang mehrmals gekippt, um eine schonende Durchmischung des Inhalts zu erzielen. Das Auszählen erfolgte in einer Zählkammer nach TÜRK im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Gesamtvergrößerung. Bei Rind, Schaf und Ziege wurden $72 \frac{1}{400} \text{ mm}^2$ große Felder ausgezählt, bei Pferd, Schwein und Hund 64 Felder von je $\frac{1}{25} \text{ mm}^2$ Grundfläche. Die Dichte der gewaschenen Spermien und der isolierten Protoplasmatröpfchen im jeweiligen Suspensionsmedium wurde ebenfalls mit dieser Methode bestimmt, wobei 72 Felder von je $\frac{1}{400} \text{ mm}^2$ ausgezählt wurden. Zur Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien (s. 3.1.1.3.1. und 3.1.1.3.2.) wurde ein Tropfen von etwa 0,01 ml Volumen auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas (18x18 mm) abgedeckt. Die Betrachtung erfolgte in einem Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch (+ 38°C) bei 400-facher Gesamtvergrößerung.

3.1.2.3. Waschen der Spermien und Isolierung der Protoplasmatröpfchen

Zur Dichtegradientenzentrifugation wurde das von WEITZE (1976) beschriebene Medium mit folgender Zusammenetzung verwendet:

Hepes-Puffer (N-2 Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure)	
20 mM	4,766 gr.
NaCl 30 mM	1,753 gr.
KOH 5 mM	0,281 gr.
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O 2,5 mM	0,895 gr.
Glukose 10 mM	1,802 gr.
Saccharose 195 mM	66,749 gr.
Aqua bidest.	ad 1 000,0 ml

Je nach Versuchsgang wurden 5 oder 10 Volumenprozent Ficoll (Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt) zugesetzt. Diese Lösungen wurden mit 1 N-NaOH auf pH 7,2 eingestellt und mit einer Atmosphäre Überdruck mittels Stickstoff durch keimfreie Zellulosenitratfilter (Sartorius; Porengröße 0,2 - 0,3 µm) gepreßt und in sterile Flaschen abgefüllt.

Zuerst wurde mit Hilfe dieses Mediums ohne Ficollzusatz die Spermiedichte des verwendeten Ejakulats auf ca. 100 000-200 000/mm³ eingestellt. Je 2 ml verdünntes Sperma wurden in 8 Zentrifugenröhrchen der Dichtegradientenzentrifugation, wie sie von WEITZE (1976) beschrieben wurde, unterzogen. Bei den Untersuchungen über den Fruktoseverbrauch diente der modifizierte Ringer-Phosphat-Puffer nach MANN (1964; s. 3.1.1.3.1.) als Suspensionsmedium für die durch die Zentrifugation erhaltenen Spermien- bzw. Protoplasmatröpfchen-pellets. Zur Bestimmung der L-Milchsäure und des ATP-Gehalts wurde dafür das Waschmedium ohne Ficoll-Zusatz verwendet.

Sowohl in der Spermiesuspension als auch in der Protoplasmatröpfchensuspension wurde eine annähernd gleiche Dichte von je ca. 100 000 - 200 000/mm³ angestrebt. Aus diesem Grund wurde nach einer vorläufigen Aufschwemmung die Dichte bestimmt und diesem Wert zufolge, wenn erforderlich, die Nachverdünnung vorgenommen. Das endgültige Suspensionsvolumen für die Pellets, die nach der Zentrifugation der Protoplasmatröpfchenfraktionen entstanden, schwankte zwischen 0,2 und 0,3 ml. Die in den einzelnen Röhrchen zurückbleibenden Spermienpellets wurden mit 0,8 - 1,2 ml suspendiert.

3.1.2.4. Quantitative photometrische Fruktosebestimmung

Die Messung des Fruktosegehalts der in 3.1.1.3.1. angeführten Proben erfolgte mit einem UV-Glukose-Test der Fa. Boehringer (Artikel-Nr.: 124 338) in der von NENNSTIEL und ALICH (1969) vorgeschlagenen Modifikation, die den Einsatz dieser Testkombination zur Bestimmung des Fruktosegehalts ermöglicht. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von Hg 365 nm mit einem Photometer der Fa. Eppendorf durchgeführt.

Die Berechnung des Fruktosegehalts der Proben wurde nach folgender Formel vorgenommen:

$(\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Blindwert}) \times 6830 = \mu\text{g Fruktose/ml Probe.}$

In Probe 3 (Protoplasmatröpfchensuspension) kam es zu einem geringgradigen Anstieg des Fruktosegehalts nach 2, 4, 6 und 8 Stunden Inkubation, in Probe 4 (mod. Ringer-Phosphat-Puffer) zu einem ebenso konstanten Abfall. Da beide Phänomene auch in Probe 1 und 2 wirksam gewesen sein mußten, wurden sie, um den Fruktoseverbrauch von Spermien mit und ohne Protoplasmatröpfchen exakter darstellen zu können, rechnerisch aus den Originalmeßwerten dieser Proben eliminiert. Der Abfall der Fruktosekonzentration in Probe 4 nach 2, 4, 6 und 8 Stunden wurde zu

den entsprechenden Meßwerten der Proben 1 - 3 addiert. Danach wurde die Zunahme des Fruktosegehaltes der Probe 3 nach 2, 4, 6 und 8 Stunden von den entsprechenden Meßwerten der Probe 1 abgezogen. Nach dieser Korrektur wurde der tatsächliche Fruktoseverbrauch der Proben 1 und 2 als Differenz der 2, 4, 6 und 8-Stunden-Werte zum 0-Stunden-Wert berechnet. Zuletzt wurde der Fruktoseverbrauch unter Berücksichtigung der gezählten Spermiedichte der Proben 1 und 2 auf jeweils 10^9 Spermien umgerechnet.

3.1.2.5. Photometrische Bestimmung der L-Milchsäure

Die Bestimmung der L-Milchsäure in den Proben (s. 3.1.1.3.2.) erfolgte nach der Methode von NOLL (1974) mit einem UV-Test (Artikel-Nr. 139 084) der Fa. Boehringer. Dazu wurden aus den Proben jeweils 300 μ l entnommen und 30 Minuten bei 6 000 g zentrifugiert. Da in den Proben 1 (Spermien + Protoplasmatröpfchen) und 2 (Spermiensuspension) nach 3- bzw. 6-stündiger Inkubation bei + 38°C die Milchsäurekonzentration stark zunahm, mußten die Meßansätze verdünnt werden, um den Meßbereich nicht zu überschreiten. Dafür wurden je 100 μ l der Proben 1 und 2 mit 400 μ l Aqua bidest. verdünnt und dann erst zentrifugiert.

Aus dem klaren Überstand wurden von jedem Zentrifugat 200 μ l für die Bestimmung der L-Milchsäure verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von Hg 365 nm an einem Eppendorf-Photometer.

Die Berechnung des Milchsäuregehalts erfolgte nach der Formel:

$(\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Blindwert}) \times 0,2968 = \text{mg L-Milchsäure/ml Probe.}$

Die Werte der verdünnten Proben wurden mit dem Faktor 5 multipliziert.

Um den tatsächlichen Einfluß der Protoplasmatröpfchen auf die Milchsäureproduktion der Spermien feststellen zu können, wurden folgende Korrekturen der Originalmeßwerte vorgenommen:

Die Werte der Proben 1, 2 und 3 wurden jeweils um den sehr geringen L-Milchsäuregehalt der Probe 4 (Waschmedium) nach unten korrigiert. Die geringgradige Zunahme der L-Milchsäure in Probe 3 (Protoplasmatröpfchensuspension) nach 3 und 6 Stunden wurde von den entsprechenden Werten der Probe 1 (Spermien + Protoplasmatröpfchen) abgezogen. Die danach errechnete Differenz der Ausgangswerte zu den jeweiligen 3- und 6-Stunden-Werten in den Proben 1 und 2 wurde als L-Milchsäureproduktion bezeichnet und in mg auf 10^9 Spermien umgerechnet.

3.1.2.6. ATP-Bestimmung

In allen Proben, in denen die Milchsäureproduktion bestimmt wurde (s. 3.1.1.3.2.), erfolgte gleichzeitig, d.h. bei 0, 3 und 6 Stunden Inkubationszeit, die Messung des ATP-Gehalts mit Hilfe eines Lumac-Cell-Testers (PRINZEN, 1977).

Die in Probe 3 (Protoplasmatröpfchensuspension) gemessenen Werte, die bei 0, 3 und 6 Stunden einen geringgradigen ATP-Gehalt anzeigten, wurden von den entsprechenden Werten der Probe 1 (Spermien + Protoplasmatröpfchen) abgezogen, um die Differenz im ATP-Gehalt zwischen Spermien ohne und mit Plasmatröpfchenzusatz quantitativ genauer darstellen zu können. Da in der Probe 4 (Waschmedium) kein ATP-Gehalt festgestellt werden konnte, erübrigte sich hier eine Korrektur. Auch in diesem Versuch wurde der ATP-Gehalt in μg auf jeweils 10^9 Spermien bezogen und so angegeben.

3.1.2.7. Elektronenmikroskopische Untersuchungen*

Um nachweisen zu können, daß die bei der Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.1.2.3.) erhaltenen Protoplasmatröpfchenpellets auch tatsächlich aus solchen bestehen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von diesen Pellets angefertigt. Gleichzeitig sollte damit auch der Reinheitsgrad der Protoplasmatröpfchenfraktion verdeutlicht werden.

Die Pellets wurden in 2% gepufferten Glutaraldehyd (0,1 M Na-Cacodylat-Puffer: pH 7,3; 31 Osm, + 4°C) fixiert, mit 1% Osmiumtetroxyd nachfixiert und nach Dehydrierung in Araldit eingebettet. Mit einem LKB-Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte angefertigt, mit 2% Uranylazetat und Bleizitrat nachkontrastiert (REYNOLDS, 1963) und in einem Elektronenmikroskop (ELMISKOP 101, Siemens) ausgewertet.

3.1.2.8. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse des Versuches über die sexuelle Belastung von Bullen wurde mit Hilfe des Tukey-Tests (WEBER, 1972) ausgewertet. Prozentzahlen wurden vorher einer arc.sin.Transformation unterzogen.

Für die Untersuchungen über den Fruktoseverbrauch, die L-Milchsäureproduktion und über den ATP-Gehalt von Bullenspermien mit und ohne Zusatz von Protoplasmatröpfchen fand ein t-Test zum Vergleich zweier voneinander abhängiger Stichproben Verwendung (MÜDRA, 1958).

* Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden dankenswerterweise von Herrn Dr. Hans-G. Liebich (Lehrstuhl für Histologie und Embryologie der Tiere, Universität München) durchgeführt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorkommen von Protoplasmatröpfchen bei verschiedenen Tierarten

Alle untersuchten Ejakulate wiesen eine Normospermie auf, jedoch lag die Spermiedichte bei den Bullen 1 und 2 an der unteren Grenze des physiologischen Bereichs (Tab. 1).

Die Zahl der Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen war bei Ziege (1,7%) und Rind (0,6%, 0%, 0,3%) sehr gering, beim Schaf konnte sogar bei keinem der Tiere ein solches Spermium gefunden werden. Bei den übrigen Spezies war dagegen eine relativ große individuelle Variation zu beobachten. Beim Pferd schwankten die Werte von 2,1% bis 7,8%, beim Schwein von 0,6% bis 15,9% und beim Hund von 0,2% bis 8,8%.

Rind, Schaf und Hund wiesen nur sehr geringe Anteile von Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen auf. Die 3 Eber hatten Anteile von 0,7%, 6,3% und 6,8%. Die höchsten Werte waren beim Pferd mit 12,0%, 8,2% sowie 22,6% zu beobachten, jedoch besaß auch der einzige untersuchte Ziegenbock 19,7% Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen.

Die Zahl der freien Protoplasmatröpfchen wird hier als Prozentsatz zur Spermienzahl (= 100%) angegeben. Es ergaben sich starke Speziesunterschiede während die individuelle Variation gering war. Nur beim Schaf war eine erhebliche Streuung der Ergebnisse bei den 3 Tieren zu beobachten (19,7%, 60,8% und 76,0%). Die höchsten Anteile freier Protoplasmatröpfchen fanden sich beim Hund, gefolgt von Schaf, Ziege, Rind und Pferd.

Tabelle 1: Vorkommen von Protoplasmatröpfchen (PT) bei verschiedenen Tierarten

Tierart	Spermien $\times 10^3/\text{mm}^3$	Proximale PT $\times 10^3/\text{mm}^3$	%	Distale PT $\times 10^3/\text{mm}^3$	%	Freie PT $\times 10^3/\text{mm}^3$	%
Pferd-Nr.	1	87	6,3	7,2	10,4	23	26,4
"	2	349	7,2	2,1	28,6	125	35,8
"	3	128	10,0	7,8	29,0	33	25,8
Rind-Nr.	1	434	2,8	0,6	5,8	164	37,8
"	2	431	0	0	0	202	46,9
"	3	744	2,2	0,3	29,0	256	34,4
Schaf-Nr.	1	340	0	0	42	3 296	76,0
"	2	098	0	0	71	809	19,7
"	3	5 720	0	0	182	3 476	60,8
Ziege-Nr.	1	3 256	55,6	1,7	642,2	1 633	50,2
Schwein-Nr.	1	88	14,1	15,9	5,6	Auszählung	
"	2	103	2,1	2,0	7,0	nicht	
"	3	361	2,3	0,6	2,7	möglich	
Hund-Nr.	1	371	0,8	0,2	3,8	291	78,4
"	2	249	22,0	8,8	0	174	69,9
"	3	316	5,7	1,8	10,7	220	69,6

Eine Auszählung der freien Protoplasmatröpfchen beim Schwein war nicht möglich, da diese schon im Nativpräparat eine Neigung zur Agglutination zeigten, die sich nach der Verdünnung in der Zählkammer noch verstärkte.

3.2.2. Die Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen

Die Untersuchungen ergaben bei den 5 Spezies, deren Ergebnisse ausgewertet wurden, ein sehr differenziertes Bild hinsichtlich der Stärke der Auswirkungen von Lagerungszeit und -temperatur auf die Haltbarkeit der freien Protoplasmatröpfchen. Eine mehr oder minder starke Reduzierung der Zahl der Protoplasmatröpfchen war jedoch bei allen untersuchten Tierarten, unabhängig von den Versuchsbedingungen, zu beobachten (Tab. 2).

Beim Hund scheint sowohl die Lagerungstemperatur als auch die Lagerungsdauer die Haltbarkeit von Protoplasmatröpfchen nur geringfügig zu beeinflussen. Während nach 6 Stunden Aufbewahrung bei den verschiedenen Temperaturen noch zwischen 85% und 96% der ursprünglich gezählten Protoplasmatröpfchen nachweisbar waren, sank dieser Anteil nach 24 Stunden Lagerung auf Werte zwischen 78% und 90%. Bei einem Vergleich der verschiedenen Lagerungsbedingungen läßt sich erkennen, daß eine Aufbewahrung bei + 22°C oder + 4°C (nach Abkühlzeit in 3 Stunden) die Protoplasmatröpfchen am besten konservierte. Nach 6 Stunden waren bei den genannten Bedingungen noch 94% bzw. 96% der Protoplasmatröpfchen aufzufinden, gegenüber 89% bzw. 90% am Ende des Versuches nach 24 Stunden.

Ein starker Einfluß der Lagerungszeit auf die Haltbarkeit von Protoplasmatröpfchen war beim Schaf zu beobachten. Während nach 6 Stunden noch zwischen 80% und 90% der ursprünglich gezählten Protoplasmatröpfchen

gefunden werden konnten, sank dieser Anteil nach 24 Stunden auf Werte zwischen 62% und 76%. Dagegen traten die durch die Lagerungstemperaturen bedingten Unterschiede in den Hintergrund. Die größte Differenz zeigten die Lagerungsbedingungen bei $+ 38^{\circ}\text{C}$ und $+ 4^{\circ}\text{C}$ (Abkühlzeit 3 Stunden) mit 80% bzw. 90% nach 6 Stunden Lagerung und 62% bzw. 76% bei Versuchsende. Da von der Spezies Ziege nur 1 Ejakulat eines Tieres untersucht wurde, soll hier nur auf die Ähnlichkeit dieser Ergebnisse mit denen vom Schaf hingewiesen werden. Einzige Ausnahme war, daß eine Aufbewahrung bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ (Abkühlzeit 3 Stunden) ganz im Gegensatz zum Schaf einen negativen Einfluß auf die Haltbarkeit der Protoplasmatröpfchen hatte (nach 6 Stunden 64%; nach 24 Stunden 58%). Beim Pferd sind bereits nach sechsstündiger Lagerungsdauer fast alle Protoplasmatröpfchen verschwunden (Werte zwischen 9% und 18%). Eine Aussage über einen Einfluß der Aufbewahrungstemperatur war daher bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich.

Die einzige Spezies, bei der sich ein sehr deutlicher Unterschied zwischen den Lagerungstemperaturen herausstellte, war das Rind. Zwar nahm auch hier bereits nach 6 Stunden die Zahl noch intakter Protoplasmatröpfchen stark ab (37% bis 75%) und fiel nach 24 Stunden auf Werte zwischen 11% und 45%, jedoch zeigte jeweils die Lagerung bei Raumtemperatur ($+ 22^{\circ}\text{C}$) die eindeutigen besten Ergebnisse (nach 6 Stunden 75%; nach 24 Stunden 45 %).

Tabelle 2: Die Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen (PT) im Sperma (Sp) von Pferd, Rind, Schaf, Ziege und Hund in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und -temperatur (Mittelwert von jeweils 3 Tieren, Prozentzahlen in Relation zum Ausgangswert)

Ausgangswert = freie PT/mm ³	Schaf	Rind	Pferd	Hund	Ziege *
	2 527 000	207 000	60 000	228 000	1 633 000
+ 38°C 6 Std. 24 Std.	80% 62%	46% 11%	9% 3%	85% 78%	97% 73%
+ 22°C 6 Std. 24 Std.	89% 72%	75% 45%	14% 6%	94% 89%	84% 77%
+ 4°C (A) 24 Std.	90% 76%	42% 23%	18% 9%	96% 90%	64% 58%
+ 4°C (B) 24 Std.	87% 70%	37% 14%	15% 7%	85% 79%	78% 70%

(A): Abkühlzeit 3 Std.

(B): Abkühlzeit 30 Min.

* nur 1 Samenprobe

3.2.3. Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Ejakulat beim Bullen

Die während der Kontrollperiode gewonnenen 60 Ejakulate von 6 Bullen hatten im Durchschnitt eine Spermiedichte von $1\,099 \pm 67,7 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). 1,4% der Spermien wiesen ein proximales, 2,9% ein distales Protoplasmatröpfchen auf. Bezogen auf die Spermienzahl (= 100%) waren 47,6% freie Protoplasmatröpfchen zu finden (Tab. 3).

In der Belastungsperiode wurden von den gleichen 6 Bullen insgesamt 10 x im Abstand von 2 bis 3 Tagen je 3 Ejakulate innerhalb von 30 Minuten gewonnen, also zusammen 180 Ejakulate. Diese teilen sich demzufolge auf in 60 Erstejakulate, 60 Zweit- und 60 Drittejakulate. Zwischen den Ejakulaten der Kontrollperiode und den Erstejakulaten der Belastungsperiode bestanden keine signifikanten Unterschiede. In keiner der 3 Ejakulatgruppen der Belastungsperiode zeigten sich Veränderungen der oben beschriebenen Merkmale, die an die fortschreitende Versuchsdauer gebunden gewesen wären. Nur zwischen den jeweils innerhalb von 30 Minuten gewonnenen 3 Ejakulaten traten statistisch zu sichernde Unterschiede bei allen untersuchten Parametern auf. Die Spermiedichte sank von $944 \pm 66,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) in den Erstejakulaten (I), über $895 \pm 54,7$ in den Zweitejakulaten (II), auf $514 \pm 35,3$ in den Drittejakulaten (Differenz zu I und II $P \leq 0,01$). Der Anteil von Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen stieg dagegen von 1,8% (I) auf 2,1% (II) und in den Drittejakulaten schließlich auf 3,2% (Differenz zu I und II $P \leq 0,01$). Das gleiche Phänomen war auch bei den Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen zu beobachten. Hier stieg der Prozentsatz von 5,0% (I) auf 8,8% in den Zweitejakulaten ($P \leq 0,05$) bis 15,3% in den Drittejakulaten (Differenz zu I und II $P \leq 0,01$).

Tabelle 3: Auswirkungen sexueller Belastung auf das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen (PT) im Ejakulat beim Bullen

Mittelwerte aus 60 Ejakulaten (6 Bullen, je 10 Ejakulate; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Kriterium	Kontrollperiode	Belastungsperiode		
		I	II	III
		Erstejakulate	Zweitejakulate	Drittejakulate
Spermien $\times 10^3/\text{mm}^3$	$1,099 \pm 67,7$	$944 \pm 66,0$	$895 \pm 54,7$	$514 \pm 35,3^{**}$
Proximale PT %	$1,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,4^{**}$
Distale PT %	$2,9 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,8$	$8,8 \pm 1,3^*$	$15,3 \pm 1,8^{**}$
Freie PT %	$47,6 \pm 1,7$	$46,6 \pm 2,0$	$62,4 \pm 2,2^{**}$	$63,1 \pm 2,5^{**}$

Alle Differenzen zwischen der Kontrollperiode und den Erstejakulaten der Belastungsperiode $P > 0,05$

Signifikante Differenzen zwischen den Ejakulaten der Belastungsperiode:

Spermiendichte: **Differenz zu I und II $P \leq 0,01$

Proximale PT : **Differenz zu I und II $P \leq 0,01$

Distale PT : *Differenz zu I $P \leq 0,05$

Freie PT : **Differenz zu I und II $P \leq 0,01$

: **Differenz zu I $P \leq 0,01$

Tukey-Test, Prozentzahlen nach arc.sin.Transformation

Die Zahl der freien Protoplasmatröpfchen, die im Erstejakulat 46,6% betragen hatte, war sowohl im Zweit- als auch im Drittejakulat (62,4% bzw. 63,1%) signifikant erhöht (Differenz zu I $P \leq 0,01$).

3.2.4. Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen auf die Motilität und den Fruktoseverbrauch von gewaschenen Spermien beim Bullen

Die Vorwärtsbeweglichkeit gewaschener Spermien schwankte bei den 9 Ejakulaten zwischen 15% und 35% (0-Stunden-Wert; Tab. 4). Die Zugabe von isolierten Protoplasmatröpfchen bewirkte eine Steigerung auf 35% bis 45%. In beiden Proben (Spermien bzw. Spermien + Protoplasmatröpfchen) sank zwar die Motilität im Verlauf der Inkubation bei + 38°C, jedoch war selbst noch nach 8 Stunden ein positiver Effekt der Protoplasmatröpfchen auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien zu beobachten.

Die Zugabe von Protoplasmatröpfchen erhöhte den Fruktoseverbrauch gewaschener Spermien (Tab. 5; Abb. 1) nach zweistündiger Aufbewahrung bei + 38°C von $1,43 \pm 0,20 \text{ mg}/10^9$ Spermien ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) auf $1,89 \pm 0,20 \text{ mg}/10^9$ Spermien (Differenz $P > 0,05$). Nach 4 und 6 Stunden war dieser Effekt wesentlich deutlicher ($P \leq 0,01$). Bei Versuchsende (8 Stunden) wiesen die Proben mit Protoplasmatröpfchen zwar noch einen etwas höheren Fruktoseverbrauch auf ($8,69 \pm 0,70 \text{ mg}/10^9$ Spermien gegenüber $7,68 \pm 0,60 \text{ mg}/10^9$ Spermien), die Differenz war aber statistisch nicht zu sichern.

Tabelle 4: Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen (PT) auf die Vorwärtsbeweglichkeit (%) gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen (3 Bullen, je 3 Ejakulate)

Bulle und Ejakulat	0 Stunden		2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden		8 Stunden	
	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT
A 1	20	40	15	25	15	25	10	20	5	15
A 2	15	45	30	40	20	30	15	25	5	10
A 3	20	40	15	30	10	20	5	15	5	10
B 4	30	40	25	30	15	20	15	20	5	5
B 5	20	40	15	30	10	25	5	15	5	5
B 6	30	45	30	40	20	25	15	15	5	5
C 7	20	35	30	40	20	30	15	20	5	5
C 8	35	40	30	40	25	30	20	25	10	15
C 9	20	40	20	35	15	25	10	20	5	10
Durchschnitt	23,3	40,6	23,3	34,4	16,7	25,6	12,2	19,4	5,6	8,9

Tabelle 5: Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen (PT) auf den Fruktoseverbrauch gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen (3 Bullen, je 3 Ejakulate) Fruktose in mg/10⁹ Spermien

Bulle und Ejakulat	2 Stunden		4 Stunden		6 Stunden		8 Stunden	
	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT
A 1	1,33	1,04	2,21	3,00	3,53	4,41	5,71	5,67
A 2	0,95	2,56	5,35	6,58	7,10	10,50	8,41	12,11
A 3	0,48	1,01	3,09	3,99	5,18	6,34	6,03	7,79
B 4	2,05	1,42	2,96	3,31	4,38	5,11	6,18	5,65
B 5	0,89	1,92	5,60	5,95	5,70	7,72	8,40	9,68
B 6	2,42	2,50	6,15	5,78	7,54	7,83	10,45	9,80
C 7	1,64	1,94	3,87	4,36	6,52	6,97	10,17	9,91
C 8	1,59	2,12	3,69	4,86	4,61	6,22	6,38	8,09
C 9	1,52	2,53	3,94	5,46	6,37	8,28	7,41	9,51
$\bar{x}$	1,43	1,89	4,09	4,81**	5,66	7,04**	7,68	8,69
$s_{\bar{x}}$	0,20	0,20	0,44	0,41	0,45	0,61	0,60	0,70

** Differenz zwischen Sp und Sp + PT $P \leq 0,01$
(t-Test für Vergleich zweier voneinander abhängiger Stichproben)

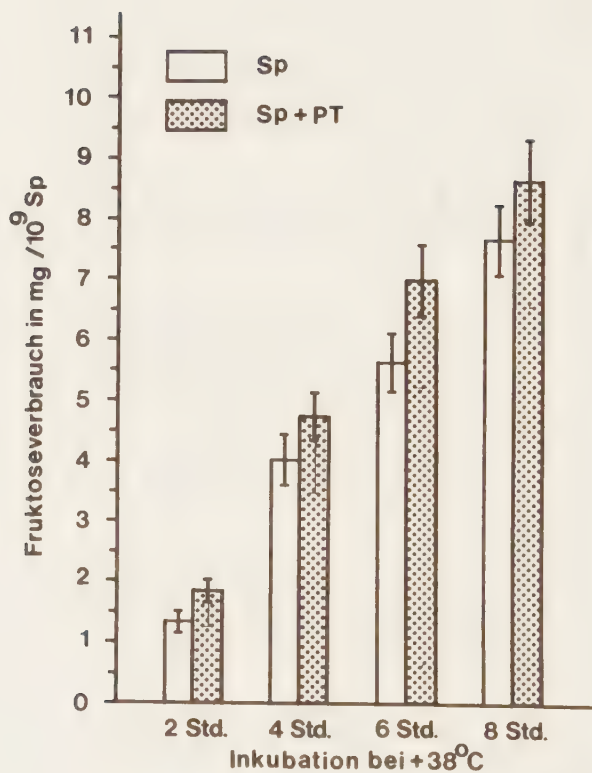


Abb. 1: Der Einfluß isolierter Protoplastatröpfchen (PT) auf den Fruktoseverbrauch gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n = 9$)
Differenz zwischen Sp und Sp+PT nach 4 und 6 Stunden
 $P \leq 0,01$

3.2.5. Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen auf die Vorwärtsbeweglichkeit, die L-Milchsäureproduktion und den ATP-Gehalt gewaschener Spermien beim Bullen

Ebenso wie im vorhergehenden Versuch steigerte die Zugabe von Protoplasmatröpfchen die Motilität der gewaschenen Spermien und zwar von 20% bis 30% auf 35% bis 50% (0 Stunden, Tab. 6). Dieser stimulierende Effekt der Protoplasmatröpfchen war, wenn auch immer schwächer, bis zum Versuchsende (6 Stunden) zu beobachten.

Die L-Milchsäureproduktion der gewaschenen Spermien betrug nach 3 Stunden $2,33 \pm 0,35 \text{ mg}/10^9$ Spermien ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) und stieg nach 6 Stunden auf $4,00 \pm 0,49 \text{ mg}/10^9$ Spermien an (Tab. 7; Abb. 2). In den Proben, die zusätzlich Protoplasmatröpfchen enthielten, betrug die L-Milchsäureproduktion nach 3 Stunden $2,77 \pm 0,39 \text{ mg}/10^9$ Spermien (Differenz zu Spermien $P \leq 0,01$) und nach 6 Stunden $4,81 \pm 0,53 \text{ mg}/10^9$ Spermien (Differenz zu Spermien $P \leq 0,01$).

Bei Versuchsbeginn (0 Stunden) wiesen gewaschene Spermien einen ATP-Gehalt von $106 \pm 6,7 \text{ } \mu\text{g}/10^9$ Spermien ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) auf (Tab. 8; Abb. 3). In Proben, denen Protoplasmatröpfchen zugesetzt waren, ergab sich ein ATP-Gehalt von $89 \pm 6,0 \text{ } \mu\text{g}/10^9$ Spermien (Differenz zu Spermien $P \leq 0,01$). Der ATP-Gehalt fiel in beiden Proben im Verlauf der Inkubation ab, der anfangs gefundene signifikante Unterschied zwischen Spermien mit und ohne Protoplasmatröpfchen blieb aber bestehen.

Tabelle 6: Der Einfluß isolierter Protoplasmatröpfchen (PT) auf die Vorwärtsbeweglichkeit (%) gewaschener Spermien beim Bullen (3 Bullen, je 3 Ejakulate)

Bulle und Ejakulat	0 Stunden		3 Stunden		6 Stunden	
	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT
A 1	30	45	20	30	10	15
A 2	30	40	15	25	10	20
A 3	25	50	20	30	10	15
B 4	30	45	15	25	5	15
B 5	25	40	15	20	5	10
B 6	30	40	10	25	5	10
C 7	20	35	10	20	5	10
C 8	25	45	10	25	5	15
C 9	30	45	15	30	10	20
Durchschnitt	27,2	42,8	14,4	25,6	7,2	14,4

Tabelle 7: Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen (PT) auf die L-Milchsäureproduktion gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen (3 Bullen, je 3 Ejakulate)
L-Milchsäure in mg/10⁹ Spermien

Bulle und Ejakulat	3 Stunden		6 Stunden	
	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT
A 1	2,59	3,05	4,14	5,12
A 2	1,16	1,39	1,95	2,32
A 3	1,39	1,96	2,18	2,81
B 4	1,40	1,77	3,19	4,42
B 5	1,35	1,60	3,26	4,01
B 6	2,59	2,83	4,64	5,24
C 7	3,92	4,49	6,33	7,03
C 8	2,97	3,82	5,15	6,48
C 9	3,62	4,04	5,14	5,82
$\bar{x}$	2,33	2,77**	4,00	4,81**
$s_{\bar{x}}$	0,35	0,39	0,49	0,53

**Differenz zwischen Sp und Sp + PT $P \leq 0,01$
(t-Test für Vergleich zweier voneinander abhängiger Stichproben)

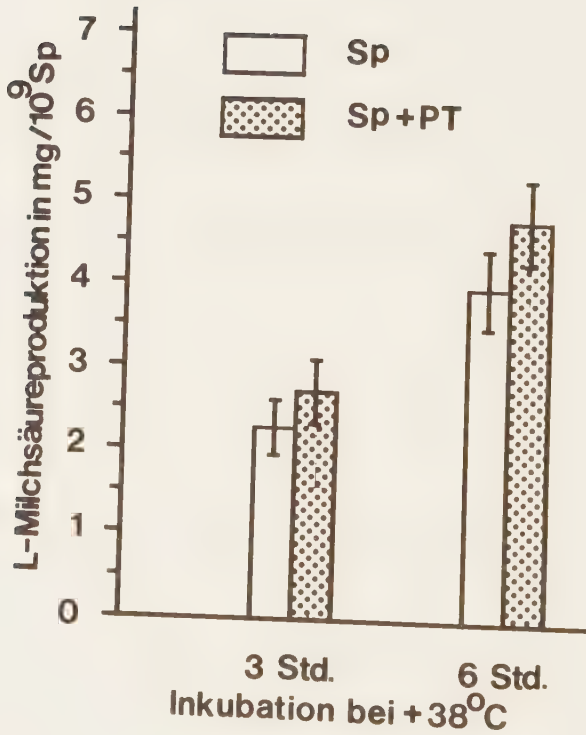


Abb. 2: Der Einfluß isolierter Protoplasmatröpfchen (PT) auf die L-Milchsäureproduktion gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n = 9$)
Differenz zwischen Sp und Sp+PT nach 3 und 6 Stunden
 $P \leq 0,01$

Tabelle 8: Der Einfluß von isolierten Protoplasmatröpfchen (PT) auf den ATP-Gehalt von gewaschenen Spermien (Sp) beim Bullen (3 Bullen, je 3 Ejakulate)
ATP in $\mu\text{g}/10^9$ Spermien

Bulle und Ejakulat	0 Stunden		3 Stunden		6 Stunden	
	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT	Sp	Sp + PT
A 1	94	84	67	65	41	36
A 2	71	54	52	45	49	39
A 3	120	105	100	89	55	52
B 4	103	90	103	103	77	51
B 5	126	101	101	83	97	76
B 6	91	76	63	55	47	39
C 7	96	79	78	56	60	42
C 8	121	97	80	62	38	31
C 9	132	114	92	81	71	60
$\bar{x}$	106	89**	82	71**	59	47**
$s_{\bar{x}}$	6,7	6,0	6,2	6,3	6,4	4,7

** Differenz zwischen Sp und Sp + PT $P \leq 0,01$
(t-Test für Vergleich zweier voneinander abhängiger Stichproben)

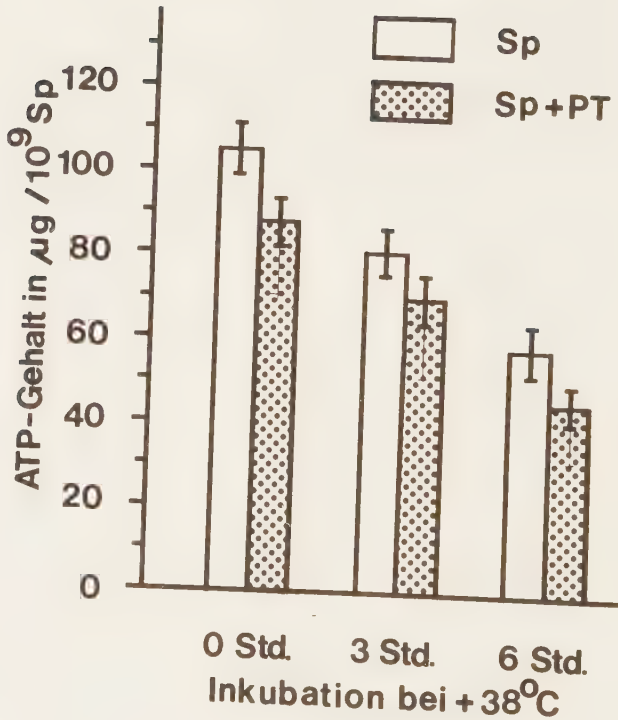


Abb. 3: Der Einfluß isolierter Protoplasmatröpfchen (PT) auf den ATP-Gehalt gewaschener Spermien (Sp) beim Bullen ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $n = 9$)
Differenz zwischen Sp und Sp+PT nach 0, 3 und 6 Stunden $P \leq 0,01$

3.2.6. Ultrastruktur von freien Protoplasmatröpfchen

Die durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Pellets aus freien Protoplasmatröpfchen enthielten weder Spermien noch Bruchstücke davon (Abb. 4).

Die etwa 2 μm großen, freien Protoplasmatröpfchen waren von einer dreischichtigen Membran umschlossen. Ihr Zytoplasma erschien gekörnt. Es enthielt feine Granula in unterschiedlicher Größe und Verteilung. Die freien Protoplasmatröpfchen wiesen als Einschlüsse ca. 0,2 μm große ovoide, membranbegrenzte Vesikel auf, deren Inhalt dem Hyaloplasma glich. Diese Vesikel schlossen zuweilen ein kleineres, membranbegrenztes Bläschen oder eine im Schnitt U-förmig erscheinende membranöse Doppellamelle ein. Die U-förmigen Elemente kamen, neben 700-800 $\text{\AA}$ großen Vesikeln, auch frei im Zytoplasma vor. Zwischen den freien Protoplasmatröpfchen waren zahlreiche unterschiedlich große Vesikel mit gleichem oder elektronenmikroskopisch dichterem Inhalt vorhanden, vermutlich aus rupturierten Protoplasmatröpfchen (Abb. 5).

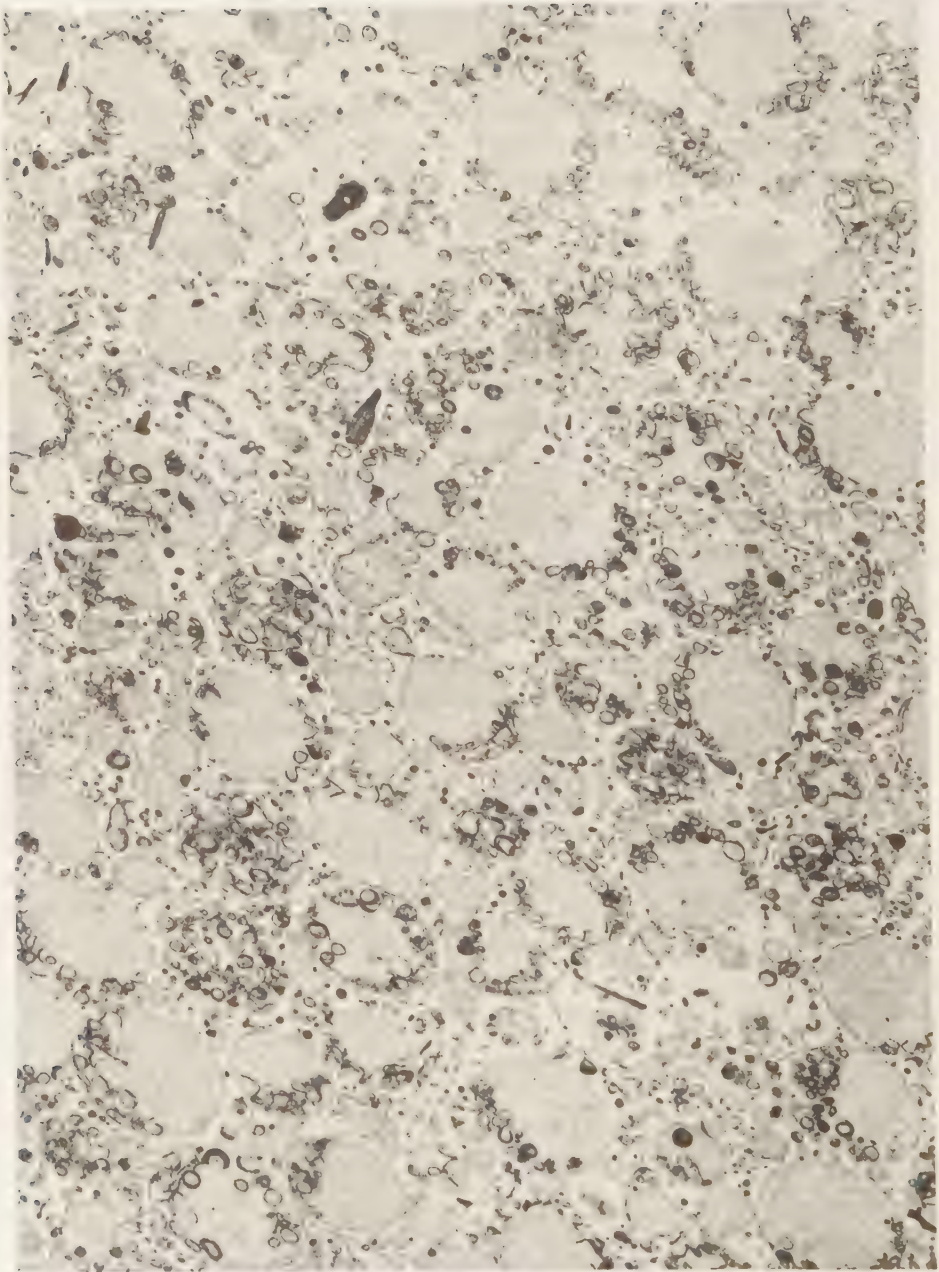


Abb. 4: Übersichtsaufnahme eines Schnittes durch ein Protoplasmatröpfchenpellet.

Dichtgelagerte Protoplasmatröpfchen ohne Beimengungen von Spermien. X 13.500

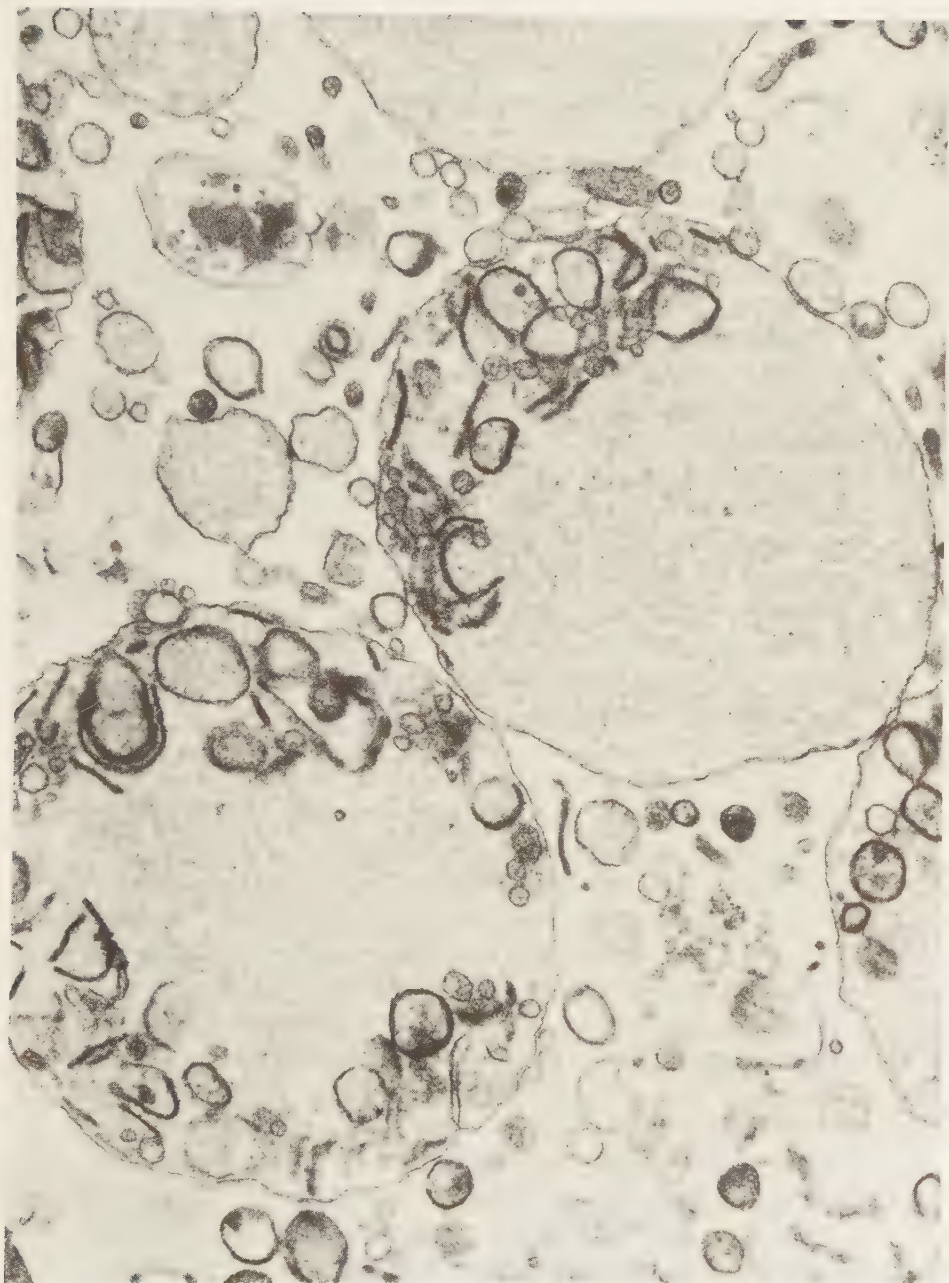


Abb. 5: Protoplasttröpfchen von dreischichtiger Membran umgeben.
In einem gekörnten Zytoplasma erscheinen ovoide Vesikel
und U-förmige Lamellen. Zwischen den Protoplasttröpfchen
unterschiedlich große Vesikeln mit ähnlichem Inhalt.
X 60.000

4. DISKUSSION

Hypothesen über Vorkommen und Funktion der Protoplasmatröpfchen haben bisher in der spermatologischen Diagnostik nur insoweit Eingang gefunden, als sie die Lokalisation der Protoplasmatröpfchen am Spermium betreffen. Danach werden Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen als "unreif" bezeichnet; ihr Vorkommen im Ejakulat wird im Hinblick auf das Befruchtungsvermögen dieser Spermaprobe negativ bewertet. Ein geringer, jedoch nicht näher bestimmter Prozentsatz von Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen im Ejakulat soll dagegen ohne Bedeutung sein. Darüber hinaus finden sich im Schrifttum Angaben, daß eine sexuelle Überbeanspruchung eines Vartieres zu einem erhöhten Prozentsatz von Spermien mit anhängenden Protoplasmatröpfchen führt, da in diesem Fall Samenzellen aus proximalen Abschnitten des Genitales zur Ejakulation gelangen.

Konkrete Angaben über physiologische Grenzen, wie sie etwa für die Spermiedichte oder -morphologie existieren, sind jedoch nicht bekannt. Bisher gibt es, abgesehen von der Darstellung einiger Einzelfälle, nur wenige experimentelle Beweise für die eine oder die andere Überlegung. So konnte DAUSEND (1974) an einem größeren Zahlenmaterial beim Schwein nachweisen, daß ein Anteil von über 10% Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen mit einem signifikanten Abfall des Konzeptionsergebnisses verbunden war. Zur Frage der sexuellen Belastung stellte SMIDT (1961), ebenfalls beim Schwein, fest, daß eine zweimalige Spermagewinnung pro Tag, über 5 Tage hinweg, zu einer Erhöhung des Anteils von Spermien mit Protoplasmatröpfchen führte. Dagegen beobachtete TIETJE (1965) bei gleichem Versuchsablauf eine anfängliche Verminderung, der ein erneuter Anstieg bis zum Erreichen des Ausgangswertes folgte. Auch eine tägliche Spermagewinnung über mehrere Wochen hatte keinen Einfluß auf das

Vorkommen von Spermien mit Protoplasmatröpfchen im Ejakulat des Ebers (ROHLOFF, 1973).

Die freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat sind erst seit den Untersuchungen von DOTT und DINGLE (1968) Gegenstand eines zunehmenden wissenschaftlichen Interesses. In der spermatologischen Diagnostik haben sie aber bisher keine Beachtung gefunden. Inzwischen ist bekannt, daß freie Protoplasmatröpfchen außer einem weiten Spektrum lysosomaler Enzyme auch solche aus dem intermediären Kohlenhydratstoffwechsel enthalten (DOTT und DINGLE, 1968; GARBERS et al., 1970; HARRISON und WHITE, 1972 b; WEITZE, 1976). Ein nicht unbeträchtlicher Teil der im Seminalplasma nachgewiesenen Aktivität von saurer Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase sowie von verschiedenen Glykosidasen stammt aus aufgelösten Protoplasmatröpfchen. Die von CLEGG und FOOTE (1973) in freien Protoplasmatröpfchen nachgewiesenen Phospholipide sollen an dem extrazellulären Phospholipidgehalt im Bullensperma zu etwa zwei Drittel beteiligt sein.

Ziel vorliegender Arbeit war es deshalb, das physiologische Vorkommen von proximalen, distalen und freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat einiger Haussäugetiere zu ermitteln und, am Beispiel des Bullen, auch die Auswirkungen sexueller Belastung auf diese Strukturen zu überprüfen. Darüber hinaus sollten spezielle Untersuchungen über die Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen sowie deren Einfluß auf den Stoffwechsel von Spermien in vitro weiteren Aufschluß über die Bedeutung der freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat bringen.

Voraussetzung für diese Untersuchungen ist eine quantitative Erfassung der Protoplasmatröpfchen. Das früher verwendete Ausstrichverfahren ist dazu nicht geeignet. Denn einmal kann es durch die damit verbundenen

Manipulationen zu einer artifiziellen Ablösung von anhängenden Protoplasmatröpfchen kommen (BLOM, 1943; GÖTTLING, 1952; BIALY und SMITH, 1958), zum anderen ist eine Bestimmung der freien Protoplasmatröpfchen nicht möglich. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Flüssigfixierung und Auszählung in einer Zählkammer (DOTT und DINGLE, 1968; HARRISON und WHITE, 1972 b) stellt ein unkompliziertes, sicheres und zeitsparendes Verfahren zur Bestimmung von Spermiedichte, Spermien mit proximalen und distalen Protoplasmatröpfchen sowie der freien Protoplasmatröpfchen in einem Arbeitsgang dar.

Die Untersuchungen über das Vorkommen von den Spermien anhängenden Protoplasmatröpfchen ergaben, daß bei den Wiederkäuern Rind, Schaf und Ziege proximale und bei Rind und Schaf auch distale Protoplasmatröpfchen nur in sehr geringer Menge vorkommen. Der Wert von 19,7% distalen Protoplasmatröpfchen bei dem einen untersuchten Ziegenbock kann nicht interpretiert werden, weil nicht zu entscheiden ist, wie weit es sich hier um eine individuelle Besonderheit handelte. Bei Pferd, Schwein und Hund scheinen dagegen Spermien mit proximalen oder distalen Protoplasmatröpfchen regelmäßiger Bestandteil des Ejakulates zu sein, wobei allerdings erhebliche Variationen von Tier zu Tier zu beobachten waren. So schwankte beim Schwein die Gesamtzahl von Spermien mit proximalen und distalen Protoplasmatröpfchen zwischen 1,3% und 22,2% und lag damit im letzteren Fall noch höher als der von DAUSEND (1974) ermittelte Wert von 19,9%. Vergleichswerte für Pferd und Hund liegen nicht vor.

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Werten für die freien Protoplasmatröpfchen starke Speziesunterschiede. Individuelle Variationen, vielleicht mit Ausnahme des Schafes, waren relativ gering. Eine Auszählung der freien Protoplasmatröpfchen beim Schwein war mit der hier

verwendeten Methode nicht möglich, da die Protoplasmatröpfchen die auch schon von HARRISON und WHITE (1972 a) beschriebenen Konglomerate bildeten. Diese Autoren ermittelten mit Hilfe einer speziellen Technik (s. 2.10.) einen Anteil von 77% freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat des Ebers. Benutzt man diesen Wert, um bei der Frage nach den Ursachen der Speziesunterschiede auch das Schwein miteinbeziehen zu können, so bietet sich vorerst nur die verschiedenartige Anlage der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, insbesondere die der Samenleiterampulle, zur Erklärung an. Danach weisen Schwein und Hund, die keine bzw. nur Reste einer Ampulle besitzen, die höchsten Anteile von freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat auf. Die Ablösung der Protoplasmatröpfchen von den Samenzellen scheint hier vermehrt nach der Ejakulation im Sperma zu erfolgen. Eine zweite Hypothese ergab sich aus den Untersuchungen über die Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen in vitro. Ordnet man die untersuchten Spezies nach der Höhe des Prozentsatzes von freien Protoplasmatröpfchen im Ejakulat ein, so ergibt sich die Reihenfolge: Hund, Schaf, Ziege, Rind und Pferd. Eine in etwa analoge Reihung erhält man bei einem Vergleich der Haltbarkeit der freien Protoplasmatröpfchen in vitro (Tab. 2). Das würde bedeuten, daß z.B. beim Hund nur wenige der abgelösten Protoplasmatröpfchen bis zum Zeitpunkt der Ejakulation zerfallen, beim Pferd dagegen sehr viele.

Eine Bestätigung der für das Rind ermittelten Werte von proximalen, distalen und freien Protoplasmatröpfchen erbrachte die der Periode erhöhter sexueller Belastung vorgeschaltete Kontrollperiode, in der insgesamt 60 Ejakulate von 6 geschlechtsgesunden Bullen ausgewertet wurden. Die dabei gefundenen Werte von 1,4% Spermien mit proximalen, 2,9% Spermien mit distalen sowie 47,6% freien Protoplasmatröpfchen können angesichts des relativ großen Zahlenmaterials als Normwerte gelten. Die minimalen bzw. maximalen Werte betrugen jeweils 0,1 bis 3,7%, 0,3 bis 18,0% und 18,4 bis 72,1%.

Die durchschnittliche Spermiedichte während der Kontrollperiode lag bei $1.099.000 \pm 67.700$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Da die Spermiedichte der in der Belastungsperiode gewonnenen Erstejakulate (I) sich nicht veränderte (944.000 ± 66.000 ; $P > 0,05$), kann davon ausgegangen werden, daß das Intervall von 48 bis 72 Stunden zwischen den Spermagewinnungstagen lang genug war, um die Entleerung der Samenspeicher durch 3 Ejakulate wieder voll auszugleichen. Eine sexuelle Überbeanspruchung war also nicht gegeben, sondern es wird deutlich, daß jeweils nur eine kurzfristige Belastung durch die Gewinnung von 3 Ejakulaten innerhalb von 30 Minuten bestand. Die Spermiedichte fiel in den Zweitejakulaten (II) auf 895.000 ± 54.700 (Differenz zu I $P > 0,05$) und in den Drittejakulaten (III) auf 514.000 ± 35.500 (Differenz zu I und II $P \leq 0,01$).

Diese Überlegungen treffen auch zu für das Verhalten der Protoplasmatröpfchen. Im ersten von jeweils drei hintereinander gewonnenen Ejakulaten, änderte sich während einer Versuchsdauer von mehr als 3 Wochen weder der Anteil der proximalen, distalen noch der freien Protoplasmatröpfchen gegenüber der Kontrollperiode. Auch hier wird an den Zweit- und Drittejakulaten ersichtlich, daß nur eine kurzfristige Belastung bestand. Dem zwar signifikanten, jedoch quantitativ geringen Anstieg der Zahl von Spermien mit proximalen Protoplasmatröpfchen von 1,8% (I) über 2,1% (II) auf 3,2% (III; Differenz zu I und II $P \leq 0,01$) dürfte dabei weniger Bedeutung zukommen als dem doch beträchtlichen Anstieg der Zahl von Spermien mit distalen Protoplasmatröpfchen. Hier ergab sich eine Erhöhung des Prozentsatzes von 5,0% (I) auf 8,8% (II; Differenz zu I $P \leq 0,05$) und schließlich auf 15,3% (III; Differenz zu I und II $P \leq 0,01$). Damit ist für den Bullen experimentell bewiesen, daß eine kurzfristige sexuelle Belastung zu einem erhöhten Vorkommen von Spermien mit anhängenden Protoplasmatröpfchen führt. Darüber

hinaus konnte gezeigt werden, daß auch die Zahl der freien Protoplasmatröpfchen Veränderungen in Abhängigkeit von der Entsamungsfrequenz unterworfen war. Während in den Erstejakulaten, bezogen auf die Spermienzahl, nur $46,6 \pm 2,0\%$ ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) zu finden waren, stieg diese Zahl auf $62,4 \pm 2,2\%$ bzw. $63,1 \pm 2,5\%$ in den Zweit- bzw. Drittejakulaten (Differenzen zu den Erstejakulaten jeweils $P \leq 0,01$). Entscheidend für die Höhe dieser Zahl ist wahrscheinlich der zeitliche Abstand zur vorhergehenden Ejakulation. Im Fall der Erstejakulate betrug diese Zeitspanne 48 bis 72 Stunden. Nachdem bekannt ist, daß von einem Großteil der in der Samenleiterampulle lagernden Spermien das Protoplasmatröpfchen bereits abgelöst ist (BRANTON und SALISBURY, 1947; RAO und HART, 1948; BIALY und SMITH, 1958), kann angenommen werden, daß während der Zeit bis zur nächsten Ejakulation ein Teil dieser freien Protoplasmatröpfchen zerfällt. Erfolgt jedoch wenige Minuten nach einer Ejakulation eine neue, so entfällt diese durch die Lagerung in der Ampulle bedingte Reduzierung. Ein quantitativer Vergleich mit den Ergebnissen der Untersuchungen über die Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen in vitro ist sicher nicht möglich, ein prinzipieller Mechanismus dieser Art ist jedoch vorstellbar. Damit könnte den freien Protoplasmatröpfchen bei Bullen eine gewisse Rolle als Indikator für das "Alter" der Spermien, d.h. für den Abstand zur letzten Ejakulation, zukommen.

Die Tatsache, daß freie Protoplasmatröpfchen ein regelmäßiger und quantitativ bedeutsamer Bestandteil des Ejakulates verschiedener Tierarten sind, legt die Vermutung nahe, daß es sich hier nicht nur um Abfallprodukte eines abgelaufenen Vorganges handelt. Gerade auch die Untersuchungen über ihre enzymatische Ausstattung (DOTT und DINGLE, 1968; GARBERS et al., 1970; HARRISON und WHITE, 1972 b; WEITZE, 1976) lassen den Schluß zu, daß die Protoplasmatröpfchen auch nach

ihrer Ablösung noch einen Einfluß auf die Spermien, insbesondere bei der Aufbewahrung in vitro haben können. Aus diesem Grunde wurde versucht, in einigen orientierenden Experimenten zu klären, ob freie Protoplasmatröpfchen den Stoffwechsel ejakulierter Spermien beeinflussen können. Als Parameter dienten Motilität, Fruktoseverbrauch, L-Milchsäureproduktion und ATP-Gehalt von gewaschenen Bullenspermien mit und ohne Zusatz von freien Protoplasmatröpfchen. Voraussetzung für dieses split-sample-Verfahren war eine Isolierung freier Protoplasmatröpfchen aus dem Ejakulat. Der Methode der Dichtegradientenzentrifugation nach WEITZE (1976) wurde deshalb der Vorzug gegenüber der Methode von HARRISON und WHITE (1972 b) gegeben, da hier ein Arbeiten bei Zimmertemperatur (ca. + 22°C) möglich war, während im anderen Fall alle Manipulationen bei + 4°C auszuführen gewesen wären. Bei den Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß beim Rind eine Lagerung der freien Protoplasmatröpfchen bei Zimmertemperatur einen deutlich positiven Effekt im Vergleich zu den anderen Lagerungsbedingungen aufwies.

Parallel zu den biochemischen Bestimmungen wurde auch die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in den Proben mit bzw. ohne Zusatz von Protoplasmatröpfchen geschätzt. Die Beobachtung, daß die Zugabe von freien Protoplasmatröpfchen die Motilität der Spermien sofort steigerte und dieser positive Einfluß bis zum Versuchsende 8 Stunden nach der Zugabe nachweisbar war, kann nur hypothetisch erklärt werden. Zu denken ist an einen ähnlichen autostimulierenden Effekt wie ihn PALM et al. (1976) für das Kallikrein-Kinin-System bereits nachgewiesen haben. Auch der Phospholipidgehalt der freien Protoplasmatröpfchen (CLEGG und FOOTE, 1973) könnte über dessen membranschützenden Eigenschaften einen positiven Stimulus für die Motilität der Spermien darstellen. Daß eine Beeinflussung der Spermien durch Zugabe von freien Protoplasmatröpfchen erfolgte, konnte

außerdem durch die Bestimmung einiger Parameter für den Stoffwechsel der Samenzellen belegt werden. Die Steigerung des Fruktoseverbrauchs der Spermien durch die Protoplasmatröpfchen dauerte zwar während der 8-stündigen Versuchsdauer an, signifikante Unterschiede ergaben sich aber nur nach 4 und 6 Stunden ($P \leq 0,01$). Geht man davon aus, daß dieser stimulierende Effekt durch Inhaltsstoffe entsteht, die erst beim Zerfall der Protoplasmatröpfchen wirksam werden, so kann noch einmal auf die Ergebnisse der in vitro Haltbarkeit von freien Protoplasmatröpfchen verwiesen werden. Bei einer Temperatur von $+ 38^{\circ}\text{C}$ kann man erwarten, daß nach 6 Stunden bereits mehr als 50% der ursprünglich vorhandenen Protoplasmatröpfchen zerfallen sind, nach 24 Stunden knapp 90%. Das könnte bedeuten, daß erst nach einer gewissen Inkubationszeit der Effekt auf den Fruktoseverbrauch faßbar wurde. Der Rückgang der stimulierenden Wirkung gegen Versuchsende nach 8 Stunden Bebrütung bei $+ 38^{\circ}\text{C}$ dürfte auf eine Erschöpfung zurückzuführen sein. Ein solches Nachlassen der Stoffwechselprozesse ist zu erwarten und allgemein bekannt, wenn zunächst eine entsprechende Stimulierung erfolgte. Analog dem Fruktoseverbrauch verhielt sich auch die Milchsäureproduktion. Die Zugabe von Protoplasmatröpfchen bewirkte eine signifikante Steigerung ($P \leq 0,01$) nach 3 und 6 Stunden Inkubation bei $+ 38^{\circ}\text{C}$. Nach den von PRINZEN (1977) veröffentlichten Erfahrungen mit der ATP-Bestimmung im Sperma mittels Biolumineszenz, lag es nahe, auch diese Methode zur Objektivierung der Motilitätsschätzungen zu verwenden. Der Autor hatte damit im split-sample-Verfahren bewiesen, daß Spermaproben mit höherer Motilität einen verstärkten ATP-Abfall aufwiesen. Dieser Effekt war auch bei diesen Untersuchungen zu beobachten. Die Tatsache, daß bereits beim 0-Stunden-Wert eine erhebliche Differenz des ATP-Gehalts der Proben mit bzw. ohne Protoplasmatröpfchen gegeben war, kann ebenfalls Folge dieses Phänomens sein, da aus versuchstechnischen Gründen von der Zugabe der Protoplasmatröpfchen bis zur ersten Messung ca. 20 Minuten verstrichen.

Schlußfolgerung:

Proximale, distale und freie Protoplasmatröpfchen sind ein regelmäßiger Bestandteil des Spermas von Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Hund. Die zusätzlich beim Bullen durchgeführten Untersuchungen über den Zusammenhang von Geschlechtsbeanspruchung und Anteil von Protoplasmatröpfchen ergaben eine positive Korrelation dieser beiden Faktoren. Bei dieser Spezies konnte auch gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen die freien Protoplasmatröpfchen Motilität, Fruktoseverbrauch und L-Milchsäureproduktion steigern sowie den ATP-Gehalt der Spermien vermindern können.

Die hier verwendete Methode der Flüssigfixierung und Auszählung in einer Zählkammer gestattet, die Bestimmung von proximalen, distalen und freien Protoplasmatröpfchen zusammen mit der Spermiendichte in einem Arbeitsgang durchzuführen. Damit ist die Grundlage gegeben, die Protoplasmatröpfchen in die spermatologische Diagnostik einzubauen, um weiteren Aufschluß über ihre funktionelle Bedeutung zu bekommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde das Vorkommen von Protoplasmatröpfchen im Ejakulat von Pferd, Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Hund, beim Rind auch in Abhängigkeit von der Deckbeanspruchung, ermittelt. Darüberhinaus wurde beim Rind auch der Einfluß von freien Protoplasmatröpfchen auf Motilität und Stoffwechsel der Spermien untersucht.
2. Die Anzahl der freien Protoplasmatröpfchen bzw. Spermien mit proximalen sowie distalen Protoplasmatröpfchen wurde, gemeinsam mit der Spermiedichte, in einem Arbeitsgang bestimmt. Dazu wurde das Sperma mit Ringer-Phosphat-Puffer nach MANN (1964), dem 0,05% Formalin zugesetzt worden war, im Verhältnis 1:100 in einer Mischpipette verdünnt. Die Auszählung erfolgte in einer Zählkammer nach TÜRK mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Gesamtvergrößerung.

Für die Stoffwechselversuche wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation die freien Protoplasmatröpfchen isoliert und gleichzeitig die Spermien gewaschen (WEITZE, 1976). Der Fruktosegehalt wurde mit einem UV-Glukose-Test der Fa. Boehringer, modifiziert nach NENNSTIEL und ALICH (1969), bestimmt, die L-Milchsäure mit einem UV-Test der Fa. Boehringer nach NOLL (1974), sowie das ATP mit einem Lumac-Cell-Tester (PRINZEN, 1977).

3. Der Hund wies, bezogen auf die Spermiedichte, die meisten freien Protoplasmatröpfchen auf (69,6% bis 78,4%), gefolgt von Schaf (19,7% bis 76,0%), Ziege (50,2%), Rind (34,4% bis 46,9%) und Pferd (25,8% bis 35,8%). Spermien mit proximalen oder distalen Protoplasmatröpfchen waren regelmäßiger Bestandteil der Ejakulate aller untersuchten Spezies (je Spezies 3 Vartiere, außer Ziege mit 1).

Einflüsse von Lagerungszeit (bis 24 Stunden) und Lagerungstemperatur (+ 38°C, + 22°C und + 4°C) auf die freien Protoplasmatröpfchen waren bei Hund, Schaf und Ziege nur schwach ausgeprägt. Beim Pferd waren nach 6 Stunden fast alle Protoplasmatröpfchen zerfallen. Beim Rind war die Temperatur (Optimum bei + 22°C) wesentlicher als die Lagerungszeit.

Bei einer verstärkten sexuellen Belastung (3 Ejakulate innerhalb von 30 Minuten) kam es bei Bullen zu einem erhöhten Anteil von proximalen, distalen sowie freien Protoplasmatröpfchen in den Zweit- und Drittejakulaten im Vergleich zu den Erstejakulaten. 2 bis 3 Tage später lagen die Werte in den Erstejakulaten wieder in der ursprünglichen Größenordnung.

Die Zugabe von isolierten freien Protoplasmatröpfchen zu gewaschenen Bullenspermien bewirkte in vitro bei + 38°C eine Steigerung der Vorwärtsbeweglichkeit bis zu 8 Stunden nach der Zugabe. Verbunden damit war eine signifikante Steigerung des Fruktoseverbrauchs und der L-Milchsäureproduktion sowie ein signifikanter Abfall des ATP-Gehalts.

4. Die beschriebenen Nachweisverfahren für Protoplasmatröpfchen, einschließlich der Abgrenzung des Einflusses von Lagerungszeit und -temperatur, ermöglichen es, diesen regelmäßigen Bestandteil des Samens in die Spermauntersuchung einzubauen. Dadurch können auch weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Protoplasmatröpfchen für die Funktion der Spermien gewonnen werden, nachdem erste Ergebnisse dieser Untersuchungen auf eine Stimulierung des Fruktoseabbaus und eine Motilitätssteigerung durch freie Protoplasmatröpfchen hinweisen.

SUMMARY

1. The incidence of protoplasmic droplets was determined in the ejaculate of horse, cattle, sheep, goat, pig and dog, in cattle also in dependence of the frequency of semen collection. Furthermore, in cattle the influence of free protoplasmic droplets on motility and metabolic activity of spermatozoa was examined.
2. The quantity of free protoplasmic droplets, respectively the spermatozoa with proximal and also distal protoplasmic droplets together with the sperm-density was carried out in one procedure. For this purpose the semen was diluted with Ringer-phosphate-buffer (MANN, 1964) which contains 0,05% Formalin in proportion of 1:100, using a mixing pipette. The count was done in a Türkescytometer with phase contrast microscope at a total magnification of x 400. For the investigation of the metabolic activity the free protoplasmic droplets were isolated and in the same time the spermatozoa were washed, using the dense layer method according to WEITZE (1976).

The fructose content was determined using an UV-glucose-test (Boehringer) modified by NENNSTIEL and ALICH (1969). The L-lactic acid was measured by means of an UV-test (Boehringer) according to NOLL (1974). ATP-content was determined according to PRINZEN (1977), using Lumac-cell-tester.

3. Related to the sperm-density, the dog showed the highest percentage of free protoplasmic droplets (69,6% bis 78,4%). followed by sheep (19,7-76,0%), goat (50,2%), cattle (34,4-46,9%) and horse (25,8-35,8%). Spermatozoa with proximal or distal protoplasmic droplets were regular constituents of the ejaculate of all studied species (of each species, 3 individuals were used except of goat, where only one animal was available).

The effect of storage time (up to 24 hours) and storage temperature (+ 38°C, + 22°C and + 4°C) on the free protoplasmic droplets of dog, sheep and goat were weakly pronounced. In the horse almost all protoplasmic droplets were dissolved after 6 hours of storage. In cattle storage temperature (optimal at + 22°C) was more essential than storage time. In condition of increased frequency of semen collection of bulls (3 successive ejaculates obtained within 30 minutes) the percentage of proximal, distal and also free protoplasmic droplets increased in the second and third ejaculate in comparison to the first one. After 2-3 days the values of the first ejaculates decreased to the initial level again. The addition of isolated free protoplasmic droplets to washed bull spermatozoa at 38°C caused an increase of the forward motility up to 8 hours. This was accompanied by a significant increase of fructose utilization and L-lactic acid production as well as a significant decrease of ATP-content.

4. The described method of counting protoplasmic droplets including the determination of the influence of storage time and temperature makes it possible to include these regular constituents of the ejaculate into the semen examination. Thereby, more informations about the significance of the protoplasmic droplets for the function of the spermatozoa can be obtained, especially because the first results of the present investigations indicated that protoplasmic droplets caused stimulation of the fructose assimilation as well as increased motility.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BAVDEK , S. und T. D. GLOVER (1970)

Alkaline phosphatase in the cytoplasmic droplet
of rabbit spermatozoa

J. Reprod. Fert. 22, 371-373

BEDFORD, J. M. (1963)

Morphological changes in rabbit spermatozoa during
passage through the epididymis

J. Reprod. Fert. 5, 169-177

BEDUHN , M. und H. ABSHAGEN (1965)

Untersuchungen an fortpflanzungsgestörten Deck-
ebern

Monatsh. Veterinärmed. 20, 96-99

BIALY , G. und V. R. SMITH (1958)

Influence of seminal vesicular fluid on morphology
of bull spermatozoa

J. Dairy Sci. 41, 422-428

BISHOP , M. W. H. und A. WALTON (1960)

Spermatogenesis and the structure of mammalian
spermatozoa

In: Marshall's Physiology of Reproduction

Ed. A. S. Parkes, Vol. I, Pt. 2. London: Longmans

BLOM , E. (1943)

The morphology of bull sperm

Maanedsskr. Dyrlaeger. 55, 185-216

Ref.: Vet. Bull. 16, 445 (1946)

BLOM , E. (1950)

Interpretation of spermatic cytology in bulls

Fertil. Steril. 1, 223-238

BLOOM , G. und L. NICANDER (1961)

On the ultrastructure and development of the
protoplasmic droplet of spermatozoa

Z. Zellforsch. 55, 833-844

BRANTON, C. und G. W. SALISBURY (1947)

Morphology of spermatozoa from different levels
of the reproductive tract of the bull

J. Anim. Sci. 6, 154-160

CLEGG , E. D. und R. H. FOOTE (1973)

Phospholipid composition of bovine sperm fractions,
seminal plasma and cytoplasmic droplets

J. Reprod. Fert. 34, 379-383

DAUSEND, C. H. P. (1974)

Vorkommen und fertilitätsdiagnostische Bedeutung von morphologisch abweichenden Samenzellen im Ebersperma unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten anhängenden Protoplasmatröpfchen
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

DOTT , H. M. und J. T. DINGLE (1968)

Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram

Exp. Cell. Res. 52, 523-540

FURMAN , J. W., L. BALL und G. E. SEIDEL (1975)

Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length

J. Anim. Sci. 40, 665-670

GARBERS, D. L., T. WAKABAYASHI und P. W. REED (1970)

Enzyme profile of the cytoplasmic droplet from bovine epididymal spermatozoa

Biol. Reprod. 3, 327-337

GÖTZE , R. (1949)

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere
Verlag M. & H. Schaper, Hannover

GÖTTLING, J. B. (1952)

Die Morphologie der Bullenspermatozoen unter besonderer Berücksichtigung der Kopfkappen
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

GRESSON, R. A. R. und I. ZLOTNIK (1945)

A comparative study of the cytoplasmic components of the male germ cells of certain mammals
Proc. Roy. Soc. Edinb. 62, 137-161

GRESSON, R. A. R. und I. ZLOTNIK (1948)

A study of the cytoplasmic components during the gametogenesis of bos taurus
Quart. J. Micr. sci. 89, 219-229

GURAYA , S. S. (1963)

Histochemistry of the cytoplasmic droplet in the mammalian spermatozoon
Experientia, 19, 94-95

HARRISON, R. A. P. und I. G. WHITE (1972 a)

Some methods for washing spermatozoa from bull, boar and ram: A comparison using biochemical and other criteria
J. Reprod. Fert. 29, 271-284

HARRISON, R. A. P. und I. G. WHITE (1972 b)

Glycolytic enzymes in the spermatozoa and
cytoplasmic droplets of bull, boar and ram, and
their leakage after shock

J. Reprod. Fert. 30, 105-115

LAGERLÖF, N. (1934)

Morphologische Untersuchungen über Veränderungen
im Spermbild und in den Hoden bei Bullen mit
verminderter oder aufgehobener Fertilität
Acta path. et. microbiol. Scand. Suppl. 19, 1-254

LASLEY , J. F. und R. BOGART (1944)

A comparative study of epididymal and ejaculated
spermatozoa of the boar

J. Anim. Sci. 3, 360-370

LEIDL , W. und W. BIEGERT (1968)

Frühzeitige sexuelle Beanspruchung und ihre
Auswirkung auf die Sexualfunktion, Entwicklung
und Nutzungsdauer bei Höhenfleckviehbullen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 81, 230-233

MANN , T. (1964)

The biochemistry of semen and of the male
reproductive tract

Methuen & Co. Ltd. London

MONIEM , K. A. und T. D. GLOVER (1972)

Alkaline phosphatase in the cytoplasmic droplet
of mammalian spermatozoa

J. Reprod. Fert. 29, 65-69

MUDRA , A. (1958)

Statistische Methoden für landwirtschaftliche
Versuche

Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg

NENNSTIEL, H. J. und R. ALICH (1969)

Fructosebestimmung im Ejakulat mittels Mikro-
litersystem

Ärztl. Lab. 15, 197-198

NOLL , F. (1974)

In: Methoden der enzymatischen Analyse

Hersg. H.U. Bergmeyer. Bd. 2, 1521-1525;

Verlag. Chemie, Weinheim.

PALM , S., W. B. SCHILL, O. WALLNER, R. PRINZEN und
H. FRITZ (1976)

Occurance of components of the kallikrein-Kinin
system in human genital tract secretions and
their possible function in stimulation of sperm
motility and migration.

In: Kinins: Pharmacodynamics and biological roles.

Eds. F. Sicuteri, N. Back, and G.L. Haberland

New York: Plenum Publishing Corporation

PAUFLE, S. K. und R. H. FOOTE (1968)

Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides

J. Reprod. Fert. 17, 125-137

PRINZEN, R. (1977)

ATP-Bestimmungen (Adenosin-Tri-Phosphat) mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien

Zuchthygiene 12, 105-108

POZZI , G. C. (1956)

Über die Histochemie des Protoplasmatröpfchens

Rec. Med. Vet. 132, 833-842

Ref.: Anim. Breed. Abstr. 25, 326 (1957)

RAO , C. K. und G. H. HART (1948)

Morphology of bovine spermatozoa

Am. J. Vet. Res. 9, 117-124

RAO , C. K. und R. O. BERRY (1949)

The cytoplasmic drop and the cytoplasmic cap in the development of boar spermatozoa

Am. J. Vet. Res. 10, 357-360

REDENZ , E. (1924)

Versuch einer biologischen Morphologie des
Nebenhodens
Arch. mikrosk. Anat. Entw. mech. 103, 593-628

RETZIUS, G. (1909)

Die Spermien der Huftiere
Biol. Untersuch. N.F. Jena 14, 163-178

REYNOLDS, E. S. (1963)

The use of lead citrate at high pH as an
electron-opaque stain in electron microscopy
J. Cell Biol. 17, 208-212

ROBERTS, M. L., W. H. SCOUTEN und S. E. NYQUIST (1976)

Isolation and characterization of the cytoplasmic
droplet in the rat
Biol. Reprod. 14, 421-424

ROEMMELE, O. (1926)

Biologische und physiologische Untersuchungen
am Sperma und am Scheidensekret des Rindes im
Hinblick auf die künstliche Besamung
München, Tierärztl. Fak. Diss.

ROHLOFF, D. (1973)

Ein Beitrag zur Beurteilung der täglichen
Spermienproduktion bei Ebern der Deutschen
Landrasse
Zuchthygiene 8, 72-75

SCHEFELS, W. (1969)

Die Spermagewinnung beim Rüden mit Hilfe
eines Vibrators
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 76, 289-290

SMIDT , D. (1961)

Untersuchungen zur Sexualpotenz und Fruchtbar-
keitsvererbung beim Schwein
Göttingen, Univ., Landwirtschaftl. Fak., Diss.

TIETJE , K. (1965)

Untersuchungen über die Sexualpotenz von Ebern
der veredelten Landschweinrasse unter besonderer
Berücksichtigung der Jungeber
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

VOGLMAYR, J. K., B. P. SETCHELL und I. G. WHITE (1971)

The effects of heat on the metabolism and
ultrastructure of ram testicular spermatozoa
J. Reprod. Fert. 24, 71-80

WEBER , E. (1972)

Grundriß der biologischen Statistik

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

WEITZE , K. F. (1976)

Bedeutung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-

Aktivitätsmessungen in der spermatologischen

Diagnostik

Zuchthygiene 11, 62-67

WHITE , I. G. und R. G. WALES (1961)

Comparison of epididymal and ejaculated semen

of the ram

J. Reprod. Fert. 2, 225-237

WILLIAMS, W. W. (1950)

Cytology of the human spermatozoon

Fertil. Steril. 1, 199-215

ZAMBONI, L., M. STEFANINI und T. HANDO (1968)

Fine structure of mammalian sperm in the

epididymis and semen

VI^e Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif.,

Paris, Vol. I, 229-231

Danksagung

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. W. LEIDL für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung sehr herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern des Lehrstuhls, besonders Herrn Dr. J. BRAUN für seine Hilfe bei der Erstellung der schriftlichen Arbeit und Frau R. HAITCHI für ihre technische Hilfe.

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Professor Dr. H. LIEBICH. Frau Privat-Dozentin Dr. I. RÜSSE sei für ihre bereitwillige Beratung gedankt. (Lehrstuhl für Histologie und Embryologie der Tiere, Universität München)

Lebenslauf

- 19.8.1945: wurde ich in Kairo/Ägypten als Sohn von Gomaa Mohamed Hassan und seiner Ehefrau Sayeda H.A. geboren
- 1951-1957: Besuch der Grundschule in Kairo
- 1957-1960: Besuch der Mittelschule in Kairo
- 1960-1963: Besuch der Oberschule in Kairo
- 1963: Ägyptisches Reifezeugnis im naturwissenschaftlichen Zweig (Abitur)
- März 1969: Erlangung des akademischen Grades eines Bachelor für Tiermedizin und Chirurgie (B.V.Sc.)
- Sept. 1969 bis Sept. 1973: Wissenschaftlicher Assistent am Tieranatomischen Institut "Abteilung für Histologie" der Tierärztlichen Fakultät an der Universität Kairo
- Sept. 1973: Erlangung des akademischen Grades eines "Master" (M.V.Sc.) zum Thema "Histological and Histochemical Studies on the uterine tube of Egyptian buffalo during different phases of estrous cycle".
- Dez. 1973 bis Sept. 1974: Assistent Lektor am Tieranatomischen Institut "Abteilung für Histologie" der Universität Kairo und Einschreibung zu Erlangung des Ph. D. bei Prof. Dr. A.N. Goerge
- Okt. 1974 bis März 1975: Besuch des Goethe-Institutes in Prien am Chiemsee zur Erlernung der deutschen Sprache
- Mai 1975 bis April 1976: Besuch des Deutsch-Kurses für Ausländer an der Universität München
- seit April 1975: war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation beschäftigt

